



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Inorgánica

Departamento de Química Orgánica

Tesis doctoral

**Estrategias organocatalíticas
para la síntesis de pirroles y compuestos tricíclicos.**

**Diseño de complejos citotóxicos de Pt y Au
con derivados de 8-hidroxiquinolina**

Cecilia Rodríguez Martín de Santos

Madrid, 2015



Facultad de Ciencias
Departamento de Química Inorgánica

CARMEN NAVARRO RANNINGER, Catedrática del Departamento de Química Inorgánica y **JOSÉ JULIÁN ALEMÁN LARA**, Investigador Ramón y Cajal del Departamento de Química Orgánica, ambos de la Universidad Autónoma de Madrid,

HACEN CONSTAR:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada **“Estrategias organocatalíticas para la síntesis de pirroles y compuestos tricíclicos. Diseño de complejos citotóxicos de Pt y Au con derivados de 8-hidroxiquinolina”** ha sido realizada en el Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid bajo nuestra dirección, y reúne las condiciones requeridas para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste, firmamos el presente en Madrid a 2 de diciembre de 2014

Carmen Navarro Ranninger

José Julián Alemán Lara

Para la realización del presente trabajo he disfrutado durante dos años de una Ayuda de Tercer Ciclo, concedida por la Universidad Autónoma de Madrid y de la financiación de los proyectos de investigación: SAF-2009-09431 y SAF-2012-34424.

Agradecemos el apoyo científico y también económico al grupo del Prof. José Luis García Ruano

Índice

Abreviaturas, acrónimos y símbolos	1
---	----------

Introducción general.....	3
----------------------------------	----------

Capítulo 1 Síntesis organocatalítica de pirroles 3,4-disustituídos.....	7
--	----------

1.1 Introducción y Antecedentes.....	9
1.1.1 Relevancia de los pirroles	9
1.1.2 Bromonitroalquenos en organocatálisis	12
1.2 Objetivos.....	15
1.3 Resultados y Discusión.....	17
1.3.1 Optimización de la reacción.....	17
1.3.2 Alcance de la reacción	18
1.3.3 Aplicaciones	20
1.3.4 Propuesta Mecanística.....	22
1.4 Conclusiones.....	23
1.5 Parte Experimental	25
1.5.1 Materiales	25
1.5.2 Técnicas	25
1.5.3 Métodos generales	26
1.5.4 Síntesis de los productos	26
1.5.4.1 Procedimiento Experimental 1A : Síntesis de los pirroles 6	26
1.6 Bibliografía	33

Capítulo 2 Síntesis enantioselectiva de derivados tricíclicos a través de un proceso de desaromatización y desimetrización organocatalítica vía dienamina.....	37
---	-----------

2.1 Introducción y Antecedentes.....	39
2.2 Objetivos.....	47
2.3 Resultados y Discusión.....	49
2.3.1 Síntesis de materiales de partida.....	49
2.3.2 Optimización de la reacción.....	50
2.3.3 Alcance de la reacción	52
2.3.4 Propuesta mecanística y cálculos computacionales	57
2.4 Conclusiones.....	63

2.5 Parte Experimental	65
2.5.1 Materiales	65
2.5.2 Técnicas	65
2.5.3 Métodos generales.....	65
2.5.4 Procedimientos experimentales y caracterización	65
2.5.4.1 Síntesis y caracterización de los materiales de partida.....	65
2.5.4.2 Síntesis de los derivados tricíclicos 11a-o	82
2.5.5 Asignación estructural compuesto 11f	90
2.6 Bibliografía	93

Capítulo 3 Nuevos compuestos de platino con ligandos derivados de 8-hidroxiquinolina: estabilidad, citotoxicidad e interacción con ADN95

3.1 Introducción.....	97
3.1.1 Los compuestos de platino en la quimioterapia del cáncer.....	97
3.1.2 Mecanismo de acción de los compuestos de platino	98
3.1.3 Toxicidad y Resistencia	99
3.1.4 Compuestos no convencionales de platino	101
3.1.5 Compuestos de platino con ligandos <i>N</i> -heteroaromáticos.....	103
3.2 Objetivos.....	107
3.3 Resultados y Discusión.....	109
3.3.1. Síntesis de los complejos	109
3.3.2 Asignación estructural del compuesto 21a	112
3.3.3 Evaluación de la actividad antitumoral	114
3.3.4 Estudio de propiedades farmacocinéticas	117
3.3.4.1 Estabilidad.....	118
3.3.4.2 Solubilidad.....	119
3.3.4.3 Lipofilia.....	120
3.3.5 Estudio de interacción con el ADN.....	121
3.4 Conclusiones	123
3.5 Parte Experimental	125
3.5.1 Materiales	125
3.5.2 Técnicas y métodos generales	125
3.5.3 Síntesis y caracterización de los productos	126
3.5.4 Evaluación biológica.....	129
3.5.5 Estudio de propiedades farmacocinéticas	130
3.5.5.1 Estabilidad.....	130
3.5.5.2 Solubilidad.....	131
3.5.5.3 Lipofilia.....	131
3.5.6 Estudio de interacción con ADN: Interacción con el plásmido pBR322	132
3.5.7 Asignación estructural del compuesto 21d	132
3.6 Bibliografía	133

Capítulo 4 Nuevos complejos de Au(III) con ligandos derivados de 8-hidroxiquinolina: estabilidad, citotoxicidad e interacción con citocromo c	137
4.1 Introducción	139
4.1.1 Los complejos de oro(III) como agentes antitumorales	139
4.1.2 Mecanismo de acción de los complejos de oro(III)	140
4.1.3 Investigación de complejos antitumorales de oro(III)	142
4.2 Objetivos	147
4.3 Resultados y Discusión	149
4.3.1. Síntesis de los complejos	149
4.3.2 Asignación estructural del compuesto 25d	152
4.3.3 Evaluación de la actividad antitumoral	153
4.3.4 Estudio del comportamiento en disolución	160
4.3.4.1 Estabilidad	160
4.3.4.2 Propiedades electroquímicas: Voltamperometría cíclica	162
4.3.4.3 Solubilidad	164
4.3.5 Estudio de interacción con el ADN	164
4.3.6 Estudio de interacción con proteínas: Interacción con citocromo c	167
4.4 Conclusiones	173
4.5 Parte Experimental	175
4.5.1 Materiales	175
4.5.2 Técnicas y métodos generales	175
4.5.3 Síntesis y caracterización de los productos	176
4.5.4 Evaluación biológica	178
4.5.5 Estudio del comportamiento en disolución	178
4.5.5.1 Estabilidad	178
4.5.5.2 Solubilidad	179
4.5.6 Estudio de interacción con ADN: Interacción con el plásmido pBR322	179
4.5.7 Interacción con citocromo c	179
4.5.8 Asignación estructural del compuesto 25d	184
4.6 Bibliografía	185
Lista de publicaciones	187

Abreviaturas, acrónimos y símbolos

En esta memoria se han empleado las abreviaturas y acrónimos recomendadas en "Guidelines for authors" (The Journal of Organic Chemistry – Standard Abbreviations and Acronyms). También se han empleado las indicadas a continuación:

A β	Péptido beta amiloide
ac	acetato
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AEDT	Ácido etilendiaminotetraacético
AIF	Apoptosis Induction Factor
BS	Bovine Serum
c	cuartete
C	Concentración
ccc-DNA	covalently closed circular deoxyribonucleic acid
Cat.	Catalizador
Ctr	Copper Transporter
cyclam	1, 4, 8, 11-tetraazaciclotetradecano
cyt c	citocromo c
CDDP	<i>cis</i> -diaminodicloroplatino(II) (cisplatino)
CF	Cromatografía Flash
COX	Ciclooxigenasa
Da	Dalton
dien	dietilendiamina
DAMP	(2-((dimetilamino)metil)fenil)
DMF	Dimetilformamida
DMP	Dess-Martin Periodinane
E°	Potencial de reducción estándar
ee	exceso enantiomérico
EI	Electronic Impact
EM	Espectrometría de Masas
EMAR	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
en	etilendiamina
esal	etilsaliciladiminato
F-TEDA	1-clorometil-4-fluoro-1,4-diazoniabicilo[2.2.2]octano
FCS	Fetal Calf Serum
GI ₅₀	Grow Inhibition Factor 50
HTS	High-Throughput Screening
MDR	Multidrug Resistance
MMR	Mismatch Repair
MPAC	Metal-Protein Attenuating Compound
MS	Mass Spectrometry/Molecular Sieve
mV	milivoltios
NER	Nucleotide Excision Repair

NMP	<i>N</i> -Metilpiridina
Nu	Nucleófilo
oc-DNA	open circular deoxyribonucleic acid
OCT	Organic Cation Transporter
OD	Optical Density
ORTEP	Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot
ox	oxalato
P.f.	Punto de fusión
Pg	Protecting group
phen	fenantrolina
PIDA	Iodosobenzene Diacetate/Phenylodonium Diacetate
PIFA	(bis(trifluoroacetoxy)iodo)benzene
pm	piridilmetanoato
ppm	partes por millón
q	quintete
r.d.	relación diastereoisomérica
Rdto.	Rendimiento
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Reactive Oxygen Species
RP-HPLC	Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography
rpm	revoluciones por minuto
SFC	Supercritical Fluid Chromatography
SMON	Subacute Myelo optic Neuropathy
sp	septuplete
sx	sextuplete
T	Temperatura
t.a.	temperatura ambiente
TBDMS	<i>tert</i> -butildimetilsililo
terpy	terpiridina
TMeAAc	Acetato de tetrametilamonio
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina Reductasa
TS	Transition State
V	Volumen

Además, se han utilizado los siguientes símbolos:

$[\alpha]_D$	Rotación óptica específica (medida con lámpara de Na)
λ	Longitud de onda
τ	Tiempo de retención (en HPLC y SFC)

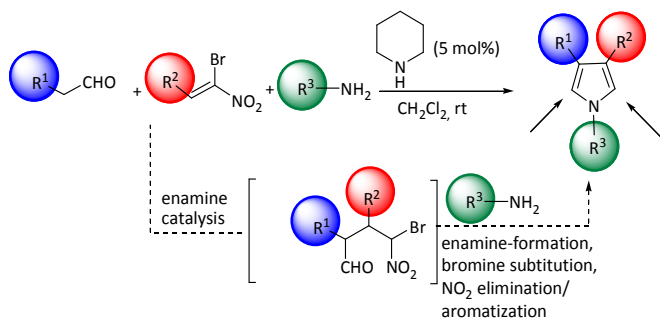
Puesto que los datos experimentales contenidos en este trabajo han sido publicados en revistas científicas internacionales, por comodidad, en el texto se ha utilizado el punto (.), en lugar de la coma (,) como separador decimal.

Introducción general

La química médica se define como el estudio de los aspectos químicos, médicos y farmacéuticos, así como de la invención, descubrimiento y preparación de compuestos biológicamente activos.¹ Por otro lado la química bioinorgánica se define como la rama de la química que estudia el papel biológico de los metales, incluyendo el estudio de las metaloproteínas, así como de metales introducidos artificialmente, incluyendo aquellos que son elementos no esenciales, en medicina y toxicología.²

En esta tesis doctoral hemos querido abordar distintos aspectos de la química orgánica e inorgánica, como herramientas básicas para las síntesis de moléculas biológicamente activas. Ambas áreas son complementarias e indiscutiblemente necesarias para el avance de nuestra sociedad. En la primera parte de esta tesis doctoral, se utilizará una nueva herramienta en química orgánica que es la organocatálisis. Así, en los capítulos 1 y 2 se describe la síntesis de pirroles y triciclos derivados, mediante la utilización de organocatalizadores, mientras que en los capítulos 3 y 4, se detalla la síntesis de nuevos complejos de platino y oro utilizando hidroxiquinolinas como ligandos.

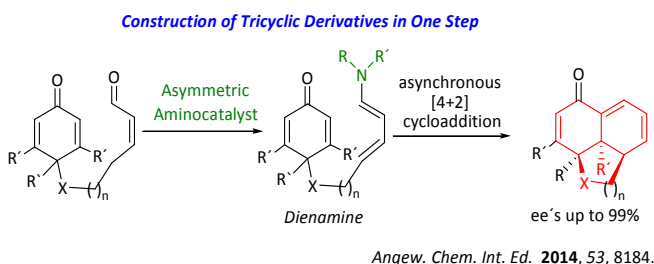
En el Capítulo 1 se muestra la síntesis organocatalítica de pirroles sustituidos en las posiciones 3 y 4, a partir de aldehídos y bromonitroalquenos, en condiciones de reacción muy suaves (via enamina³), y con rendimientos muy altos (Esquema 1). Los pirroles han demostrado ser unos heterociclos con un amplio espectro de aplicabilidad, siendo muy destacable su importancia dentro de la química médica por el gran número de productos que poseen actividad biológica.⁴



Chem. Cat. Chem. **2012**, *4*, 976

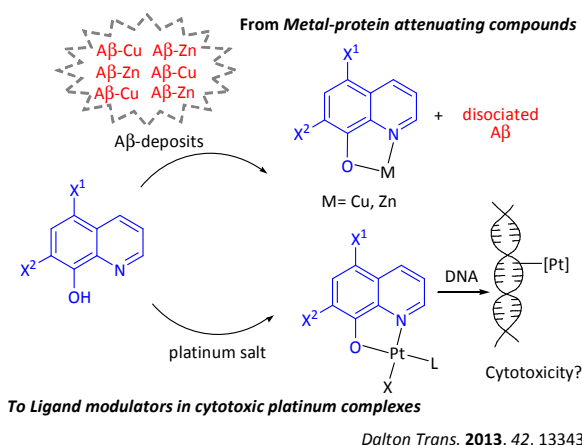
Esquema 1

En el Capítulo 2, se aborda la síntesis de triciclos derivados que están presentes en un gran número de compuestos biológicamente activos, como son la momilactona A, la azadirachtina, nagilactona F, o la oidiolactona. Nuestra aportación, consiste en una nueva aproximación organocatalítica para la síntesis de estos derivados utilizando la química de dienamina⁵ (Esquema 2).



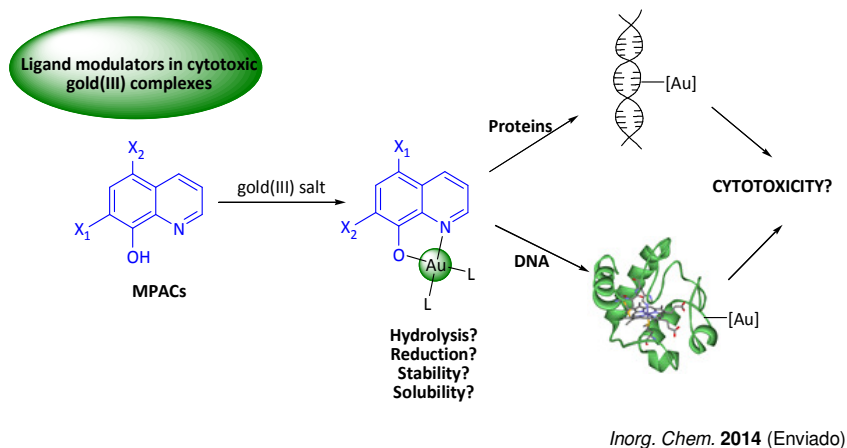
Esquema 2

Los complejos de platino (p.ej. cisplatino y carboplatino) constituyen fármacos antitumorales de referencia a nivel mundial.⁶ Sin embargo, los inconvenientes derivados de su uso, como son su toxicidad o la resistencia, han motivado la búsqueda de nuevos complejos con perfiles de actividad y toxicidad mejorados. El Capítulo 3 se centra en la síntesis de nuevos complejos de platino con ligandos basados en la 8-hidroxiquinolina; siendo considerada esta última una estructura “privilegiada” en química médica. Adicionalmente, se presentan sus datos citotoxicológicos y, además algunas importantes propiedades farmacocinéticas.



Esquema 3

Debido al reciente interés en el desarrollo de compuestos antitumorales basados en metales distintos de platino,⁷ como último capítulo de esta tesis doctoral y en conexión con el anterior, en el Capítulo 4 se plantea la síntesis y evaluación citotóxica de una serie análoga de complejos de oro(III) que incluyen hidroxiquinolininas como ligandos.



Esquema 4

¹

²

³ S. Mukherjee, J. W. Yang, S. Hoffmann, B. List, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 5471.

⁴ a) V. Estévez, M. Villacampa, J. C. Menéndez, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 4402; b) V. Estévez, M. Villacampa, J. C. Menéndez, *Chem Soc Rev* **2014**, 43, 4633 y referencias citadas en él.

⁵ D. B. Ramachary, Y. V. Reddy, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 865.

⁶

⁷ S. H. van Rijt, P. J. Sadler, *Drug Discov Today* **2009**, 14, 1089.

Capítulo 1

Síntesis organocatalítica de pirroles 3,4-disustituidos

El pirrol constituye uno de los heterociclos más abundantes en la naturaleza además de presentar múltiples aplicaciones en síntesis orgánica, farmacología o ciencia de materiales. Sin embargo, a pesar de la existencia de numerosos métodos para su obtención, la síntesis de pirroles 3,4-disustituidos continúa representando un reto en la actualidad.

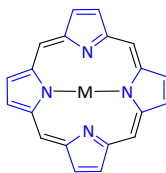
En el presente capítulo, se describe el desarrollo de una nueva metodología enmarcada en el área de la organocatálisis, para la síntesis, a partir de aldehídos y (Z)- β,β -bromo-nitroalquenos, de pirroles 3,4-disustituidos.

1.1 Introducción y Antecedentes

1.1.1 Relevancia de los pirroles

Los pirroles constituyen uno de los heterociclos más comunes debido a que el anillo de pirrol forma parte de la estructura de una gran variedad de productos naturales,⁸ fármacos⁹ y, más recientemente, de nuevos materiales¹⁰ con propiedades semiconductoras,¹¹ entre otras.

Su relevancia biológica es conocida desde que fuera descubierto su papel estructural en dos proteínas esenciales para la vida: la hemoglobina y la clorofila, así como en otras proteínas donde se encuentra formando parte de su grupo prostético, una metaloporfirina, que consiste en un anillo tetrapirrónico coordinado a un metal (Figura 1.1), como son la mioglobina, citocromos, catalasas, peroxidasas y la vitamina B₁₂.¹²

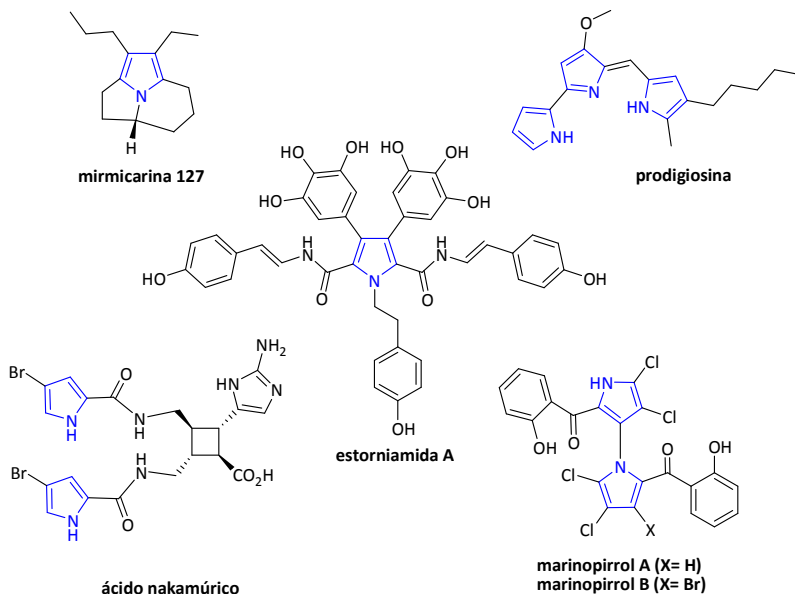


M = Fe²⁺ (Hemoglobina, Mioglobina, Citocromos, Catalasas, Peroxidasas)
M = Mg²⁺ (Clorofila)
M = Co²⁺ (Vitamina B₁₂)

Figura 1.1

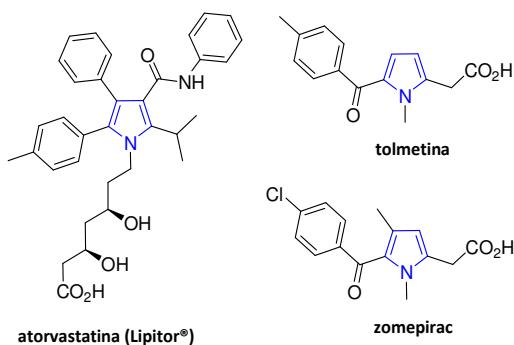
Anillo tetrapirrónico de las metaloporfirinas.

Sin embargo, los pirroles se encuentran presentes en muchos otros productos naturales bioactivos (véase Figura 1.2), como los alcaloides de la familia de las mirmicarinas,¹³ aislados de la hormiga *Myrmecaria opaciventris* o las prodigiosinas,¹⁴ trispirroles con potente actividad antitumoral. Incluso, están presentes en otros productos con actividad biológica muy variada, como inhibidores de fusión del VIH¹⁵ o antituberculosos.¹⁶ Además, son muy abundantes en el medio marino, de donde se han aislado el ácido nakamúrico,¹⁷ los marinopirroles¹⁸ o la familia de las estorniamidas,¹⁹ las cuales han mostrado una potente actividad como inhibidores del fenómeno de multirresistencia a los fármacos (MDR: Multidrug Resistance), que se produce durante el tratamiento del cáncer con quimioterapia.

**Figura 1.2**

Productos naturales que incluyen pirrol en su estructura.

Los pirroles forman parte también de la estructura de numerosos fármacos (Figura 1.3), siendo el más conocido la atorvastatina (Lipitor®),²⁰ un antihipercolesterolémico que destaca por ser el fármaco más vendido de la historia, aunque también se pueden encontrar por ejemplo, en antiinflamatorios no esteroideos, como la tolmetina y el zomepirac.

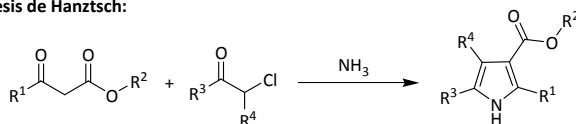
**Figura 1.3**

Fármacos que incluyen pirrol en su estructura.

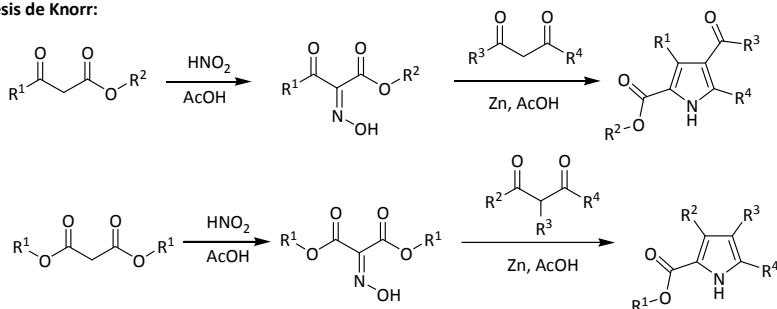
Durante el último siglo, los métodos más frecuentemente utilizados para la síntesis de pirroles han sido los métodos clásicos de Hantzsch,²¹ Knorr²² y Pal-Knorr²³ (Esquema 1.1), los cuales funcionan mejor para la obtención de pirroles altamente sustituidos. Sin embargo, el núcleo de pirrol puede presentar hasta cinco sustituyentes, y por lo tanto el diseño de metodologías que permitan la obtención controlada de patrones de sustitución determinados en el pirrol, ha constituido un importante desafío sintético.

Con el objetivo de solventar las limitaciones de los métodos clásicos, han surgido posteriormente diversos métodos de síntesis de pirroles,^[Error! Marcador no definido.] los llamados “no clásicos”, como por ejemplo reacciones multicomponente y ciclaciones catalizadas por metales. Sin embargo, la mayor parte de los nuevos métodos se basan en reacciones en varias etapas, emplean metales o condiciones de reacción drásticas y únicamente son útiles para la obtención de pirroles 2,3,4,²⁴ 2,3,5,²⁵ 2,4²⁶ o 2,5²⁷-sustituidos. Sin embargo, la obtención de pirroles 3,4-disustituidos continúa representando en la actualidad un desafío sintético.

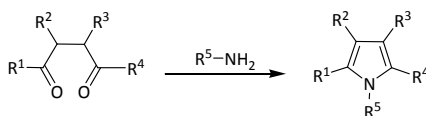
Síntesis de Hantzsch:



Síntesis de Knorr:



Síntesis de Pal-Knorr:



Esquema 1.1

Métodos clásicos de síntesis de pirroles.

Al igual que el resto de pirroles, los pirroles 3,4-disustituidos se encuentran presentes en distintos productos naturales, como la halitulina e isohalitulina²⁸ (Figura 1.4) y

también forman parte de la estructura de diversos fármacos, como algunos inhibidores de la COX²⁹ y ciertos agentes antifúngicos.³⁰ Además representan una importante unidad estructural para la síntesis de polímeros conductores y películas poliméricas,³¹ los cuales están en clara ventaja sobre el polipirrol, ya que el patrón de sustitución 3,4 evita el acoplamiento α - β y β - β durante la polimerización electroquímica³² y la naturaleza de los dos sustituyentes permite controlar la geometría, solubilidad y reactividad^{33,34} del polímero. Además, los pirroles 3,4-disustituídos se utilizan en la síntesis de porfirinas con interesantes propiedades electrónicas, ópticas y de cristales líquidos, mediante su ciclotetramerización con formaldehído o aldehídos aromáticos.³⁵

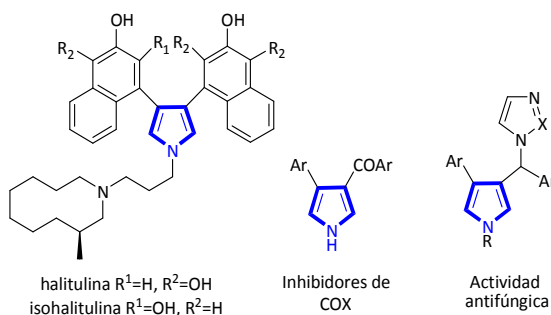


Figura 1.4

Pirroles 3,4-disustituídos en productos bioactivos.

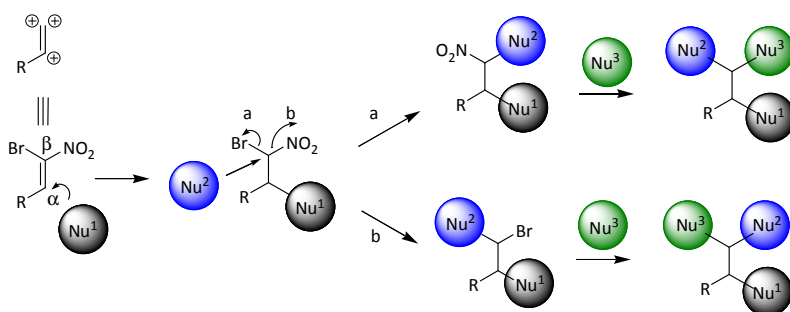
De manera que, considerando la presencia de este tipo de estructuras en productos naturales bioactivos, fármacos y nuevos materiales, así como la escasez de métodos para la obtención de esta sustitución sobre el pirrol, se hace necesario el desarrollo de nuevos métodos de síntesis de pirroles que no utilicen metales, que puedan llevarse a cabo en condiciones suaves de reacción y que proporcionen el patrón de sustitución 3,4 de un modo general.

1.1.2 Bromonitroalquenos en organocatálisis

El éxito de la organocatálisis se debe en gran medida al hecho de que en este tipo de catálisis no es necesario el empleo de metales ni de condiciones duras de reacción. Por lo tanto, la idea de llevar a cabo la síntesis de pirroles 3,4-disustituídos dentro de esta área supondría una marcada ventaja frente a los métodos existentes, entre los cuales no ha sido descrito ningún método organocatalítico. Por otra parte, la utilización de un material de

partida con una reactividad versátil que permita incorporar en las posiciones 3 y 4 del pirrol la sustitución deseada de una manera general, sería muy adecuado. Un material de partida de este tipo previamente muy utilizado en síntesis orgánica son los (Z)-β,β-bromo-nitro-alquenos.³⁶

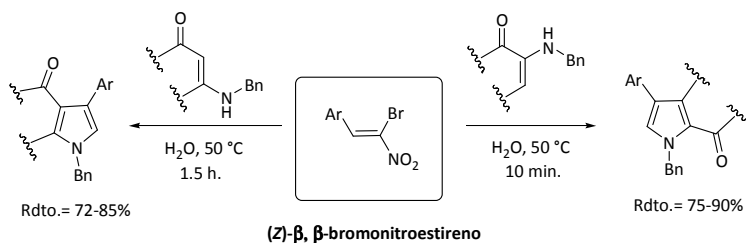
Los (Z)-β,β-bromo-nitro-alquenos deben su interés en síntesis a que pueden comportarse como sintones di o tripositivos. La presencia en la posición β de dos grupos electrón-atractores, (un átomo de bromo y un grupo nitro), posibilita el ataque nucleófilo en la posición α y, por otra parte, al ser estos dos grupos, buenos grupos salientes, pueden ser sustituidos también mediante ataque en su posición β, por un segundo y un tercer nucleófilo, o ser eliminados mediante distintos tipos de reacciones (Esquema 1.2).



Esquema 1.2

(Z)-β,β-bromo-nitro-alquenos como sintones "di- o tri-positivos".

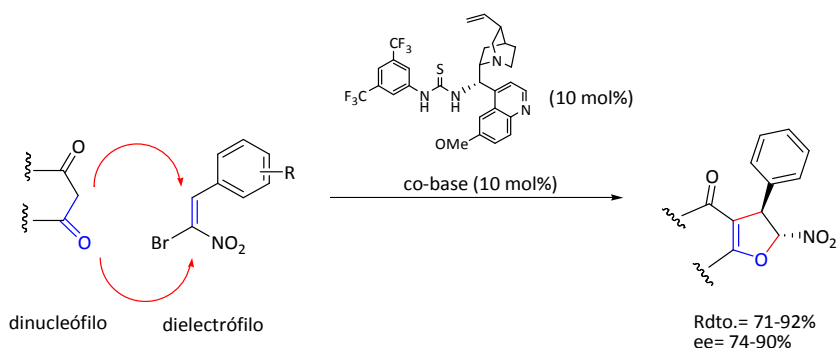
Así, los (Z)-β,β-bromo-nitro-alquenos han sido utilizados para llevar a cabo diferentes tipos de transformaciones, en la mayoría de las cuales se emplean catalizadores metálicos.³⁷ En 2010, fue descrito un sencillo método para la síntesis en agua de pirroles 2,3,4 y *N*-tetrasustituídos a partir de (Z)-β,β-bromo-nitroalquenos y enaminonas, en el que no se utilizaban metales (Esquema 1.3).³⁸



Esquema 1.3

Síntesis de pirroles en agua a partir de (Z)-β,β-bromo-nitroalquenos.

Más tarde, y en el mismo año, los grupos de Rueping³⁹ y Ping⁴⁰ publicaron simultáneamente la síntesis enantioselectiva y organocatalítica de dihidrofuranos a partir de (Z)-β,β-bromo-nitro-estirenos y derivados 1,3-dicarbonílicos (Esquema 1.4), en presencia de un catalizador bifuncional de tiourea y una base como cocatalizador, obteniendo los productos finales con buenos rendimientos y de moderados a excelentes excesos enantioméricos, empleando por primera vez los (Z)-β,β-bromo-nitro-alquenos como material de partida en un proceso organocatalítico.



Esquema 1.4

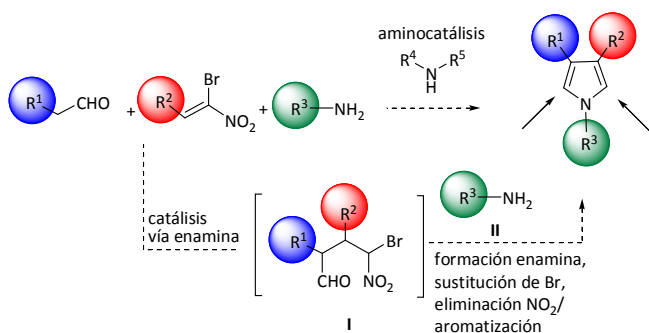
Síntesis enantioselectiva de dihidrofuranos a partir de (Z)-β,β-bromo-nitroalquenos.

Por lo tanto, debido a nuestra experiencia en organocatálisis⁴¹ y dada la interesante reactividad de los (Z)-β,β-bromo-nitro-alquenos, la cual los convierte en excelentes sustratos dentro de esta área, ya que son susceptibles de sufrir ataques nucleófilos y/o eliminaciones en cascada, de forma intramolecular y en condiciones suaves, se planteó la posibilidad de desarrollar un método organocatalítico para la síntesis de pirroles 3,4-disustituídos utilizando (Z)-β,β-bromo-nitroalquenos como material de partida.

1.2 Objetivos

Puesto que la mayoría de los métodos de síntesis de pirroles implican reacciones en varias etapas, condiciones de reacción duras, reactivos costosos y raramente proporcionan la sustitución deseada en las posiciones 3 y 4, el objetivo de este capítulo es el desarrollo de una nueva metodología organocatalítica para la obtención de pirroles 3,4-disustituídos, que supere las desventajas de los métodos existentes y constituya un método general para la síntesis de pirroles con este patrón concreto de sustitución. La síntesis se enmarca en el área de la organocatálisis y consiste en un método modular basado en tres componentes, los cuales incorporarán la sustitución deseada en las posiciones 3 y 4 del pirrol final, así como en el átomo de nitrógeno.

La nueva metodología se ha planteado en base a la adición Michael 1,4 de aldehídos alquílicos vía enamina, a (Z)- β,β -bromo-nitro-alquenos, en la que se genera el intermedio **I** (Esquema 1. 5), el cual tras reacción con la amina **II**, daría lugar al pirrol 3,4-disustituído deseado, tras sustitución del bromo, eliminación del grupo nitro y aromatización.



Esquema 1.5

Objetivos.

Por tanto, los objetivos de este capítulo pueden concretarse en los siguientes:

- 1) Búsqueda de las condiciones óptimas de reacción, en cuanto a la naturaleza y carga del catalizador, tipo de disolvente, temperatura y tiempo de reacción.
- 2) Estudio del alcance de la reacción en cuanto a la posibilidad de la introducción de diferentes sustituyentes en las posiciones 1,3 y 4.

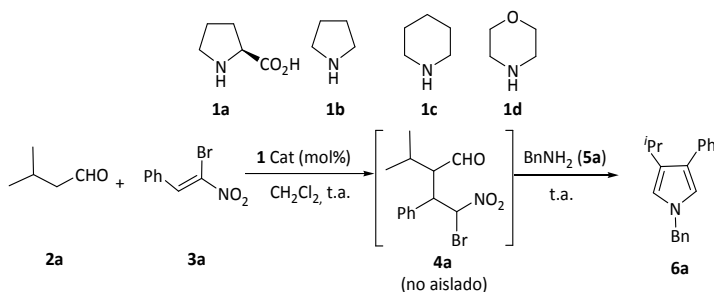
- 3) Aplicación de la metodología a la obtención de sustratos de interés y de mayor complejidad estructural.

1.3 Resultados y Discusión

1.3.1 Optimización de la reacción

Tal y como se describe en la Tabla 1, se comenzó la optimización evaluando varios catalizadores y condiciones de reacción. Bajo condiciones estándar (t.a., CH_2Cl_2 , 20 mol % de carga de catalizador) se probó en primer lugar el catalizador prolina, **1a**, con el que se obtuvo una baja conversión tras 24 horas de reacción (entrada 1, Tabla 1.1). Puesto que el producto final es aquiral, se probó a continuación la utilidad en este caso de organocatalizadores aquirales, que presentan un menor coste económico. Interesantemente, el catalizador **1b** (entrada 2, Tabla 1.1) dio lugar a una conversión moderada, mientras que su análogo de seis miembros **1c** (piperidina) incrementó la reactividad hasta conversión total en el mismo tiempo de reacción de 1.5 horas (entrada 3, Tabla 1.1). Con la morfolina **1d** se obtuvo una conversión más baja con respecto a la piperidina **1c** (comparar entradas 3 y 4, Tabla 1.1).

Debido a la alta reactividad encontrada para el catalizador **1c**, se procedió a reducir la carga catalítica (entradas 5-7, Tabla 1.1). La reducción hasta un 10 y un 5 mol %, no produjo una disminución ni en la conversión ni en el rendimiento de la reacción (entradas 5 y 6, Tabla .11). Sin embargo, cuando la reacción se llevó a cabo con sólo 1 mol % de catalizador **1c**, la velocidad de la reacción disminuyó notablemente, de manera que se necesitaron 24 horas para obtener una conversión total (entrada 7, Tabla 1.1). Por último, se intentó reducir la cantidad de aldehído a 1.2 equivalentes, produciéndose una conversión total en un tiempo significativamente mayor (8 horas) y un rendimiento mucho más bajo (entrada 8, Tabla 1.1). Por lo tanto, con las condiciones de la entrada 6, se procedió al estudio del alcance de la reacción.

Tabla 1.1Optimización de las condiciones de reacción para la obtención de pirroles **6**.

Entrada ^a	Catalizador (mol%)	Tiempo (h)	Conversión	Rendimiento (%) ^c
1	1a (20 mol%)	24	20	-
2	1b (20 mol%)	1.5	50	-
3	1c (20 mol%)	1.5	100	65
4	1d (20 mol%)	1.5	70	-
5	1c (10 mol%)	1.5	100	90
6	1c (5 mol%)	1.5	100	88
7	1c (1 mol%)	24	100	72
8	1c (5 mol%) ^b	8	100	57

^a Todas las reacciones se llevaron a cabo con 0.44 mmol de nitroalqueno **3a**, 0.88 mmol de aldehído **2a** y 1.0 mmol de BnNH_2 en 0.9 mL de CH_2Cl_2 . ^b En este caso la cantidad de aldehído se redujo a 0.53 mmol. ^c Rendimiento de producto aislado.

1.3.2 Alcance de la reacción

En primer lugar se llevó a cabo la reacción utilizando nitroalquenos diferentemente sustituidos (entradas 1-7, Tabla 1.2). La reacción resultó compatible con diferentes sustituyentes aromáticos (entradas 1-6, Tabla 1.2) con grupos electrón-donadores en la posición *para* (Me y MeO, entradas 2 y 4, Tabla 1.2), aunque en este último caso (entrada 4) se necesitó un 20 mol % de catalizador para obtener una conversión completa. Por otra parte, todas las reacciones se llevaron a cabo en una escala de 0.44 mmol excepto en el caso de la entrada 3, que fue realizada en una escala de 4.4 mmol, obteniéndose **6b** con un rendimiento del 85 %, lo cual pone de manifiesto la escalabilidad de esta reacción catalítica. A continuación se evaluó la influencia de la sustitución por halógenos en el anillo aromático en las posiciones *orto* y *para* (entradas 5 y 6, Tabla 1.2), resultando igualmente compatibles y mostrando tan

solo una ligera disminución del rendimiento. Por último, se estudió la reacción con un sustituyente alquílico sobre el bromonitroalqueno, obteniéndose el dialquilpirrol **6f**, siendo en este caso necesario el uso de un 20 mol % de catalizador.

La utilización de aldehídos con diferentes sustituyentes (entradas 8-10, Tabla 1.2), es también compatible con este sistema catalítico, obteniéndose los productos correspondientes con buenos rendimientos, tanto en el caso de sustituyentes alquílicos lineales (*n*-propilo y *n*-hexilo, entradas 8 y 9, Tabla 1.2) como en el caso de un sustituyente alquílico funcionalizado (aldehído **2d**), que da lugar al pirrol bencil sustituido **6i** (entrada 10, Tabla 1.2).

Tabla 1.2

Alcance de la reacción con distintos aldehídos **2** y bromonitroalquenos **3**.

$$\text{R}^1\text{-CH}_2\text{CHO} + \text{R}^2\text{-CH=CH-Br-NO}_2 \xrightarrow[\text{CH}_2\text{Cl}_2, \text{ t.a.}]{\text{1c (5 mol \%)}} \text{R}^1\text{-CH}_2\text{-CH(R}^2\text{)-CH=CH-N(Bn)-CH(R}^1\text{)-CH}_2\text{CHO} \xrightarrow{\text{después BnNH}_2 \text{ (5a)}} \text{Pyrrole 6a-i}$$

Entrada ^a	R ¹	R ²	Compuesto	Rendimiento (%)
1	<i>i</i> Pr- 2a	Ph- 3a	6a	88
2	<i>i</i> Pr- 2a	<i>p</i> -MeC ₆ H ₄ - 3b	6b	76
3	<i>i</i> Pr- 2a	<i>p</i> -MeC ₆ H ₄ - 3b	6b	85 ^b
4	<i>i</i> Pr- 2a	<i>p</i> -MeOC ₆ H ₄ - 3c	6c	62 ^c
5	<i>i</i> Pr- 2a	<i>p</i> -ClC ₆ H ₄ - 3d	6d	58
6	<i>i</i> Pr- 2a	<i>o</i> -FC ₆ H ₄ - 3e	6e	57
7	<i>i</i> Pr- 2a	<i>n</i> -Bu- 3f	6f	45 ^c
8	<i>n</i> -Pr- 2b	Ph- 3a	6g	79
9	<i>n</i> -Hexil- 2c	Ph- 3a	6h	65
10	PhCH ₂ - 2d	Ph- 3a	6i	61

^aTodas las reacciones fueron llevadas a cabo con 0.44 mmol de nitroalqueno **3**, 0.88 mmol de aldehído **2** y 1.0 mmol de BnNH₂ (**5a**) en 0.9 mL de CH₂Cl₂. ^b Esta reacción fue llevada a cabo a escala de 4.4 mmol. ^c Para obtener conversión completa se necesitó un 20 mol% de catalizador **1c**.

Por último, se estudió la sustitución sobre el nitrógeno mediante la utilización de distintas aminas (Tabla 1.3). La reacción permitió la incorporación de distintas aminas alquiladas con restos bencílicos, vinílicos, alquílicos lineales e incluso *terc*-butílicos (entradas 1-4, Tabla 1.3). La incorporación de anilina a la estructura

pirrolidínica fue posible con un rendimiento menor, probablemente debido a la baja nucleofilia de esa especie (entrada 5, Tabla 1.3). Finalmente se intentó la incorporación directa de amoníaco, con objeto de obtener el pirrol 3,4-disustituido sin grupo protector en el nitrógeno, pero los intentos llevados a cabo fueron infructuosos (entrada 6, Tabla 1.3).

Tabla 1.3

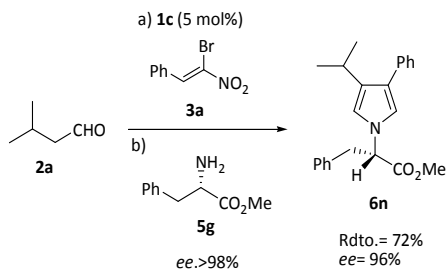
Distintas aminas utilizadas en la síntesis de los pirroles **6**.

Entrada ^a	R ³	Compuesto	Rendimiento (%)
1	BnNH ₂ - 5a	6a	88
2	Alil-NH ₂ - 5b	6j	90
3	<i>t</i> -Bu-NH ₂ - 5c	6k	>99
4	<i>n</i> -Octil-NH ₂ - 5d	6l	55
5	Ph- 5e	6m	52
6	NH ₃ - 5f	-	n.r. ^b

^a Todas las reacciones se llevaron a cabo con 0.44 mmol de nitroalqueno **3a**, 0.88 mmol de aldehído **2a** y 1.0 mmol de R³NH₂ en 0,9 mL de CH₂Cl₂. ^b No reacciona.

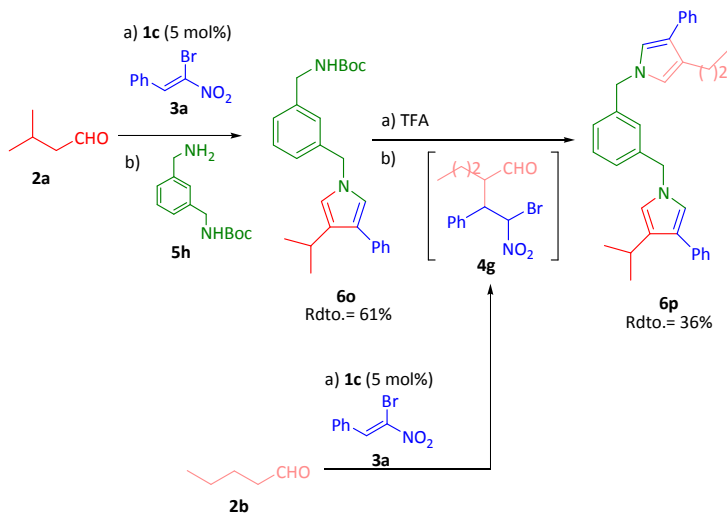
1.3.3 Aplicaciones

En la bibliografía se encuentran descritos un gran número de ejemplos que contienen un aminoácido quiral en el nitrógeno pirrolidínico.⁴² Uno de los mayores problemas de las metodologías descritas consiste en la fácil epimerización del aminoácido derivado. Para ello se hizo reaccionar el aldehído **2a**, con el nitroalqueno **3a**, introduciéndose seguidamente el éster metílico del aminoácido *L*-fenilalanina. Sorprendentemente, mediante esta metodología apenas se produjo epimerización, obteniéndose el pirrol *N*-quiral **6n**, con un buen rendimiento y un exceso enantiomérico del 96%, determinado por HPLC.


Esquema 1.6

Aplicación de la metodología a la obtención de un producto quiral.

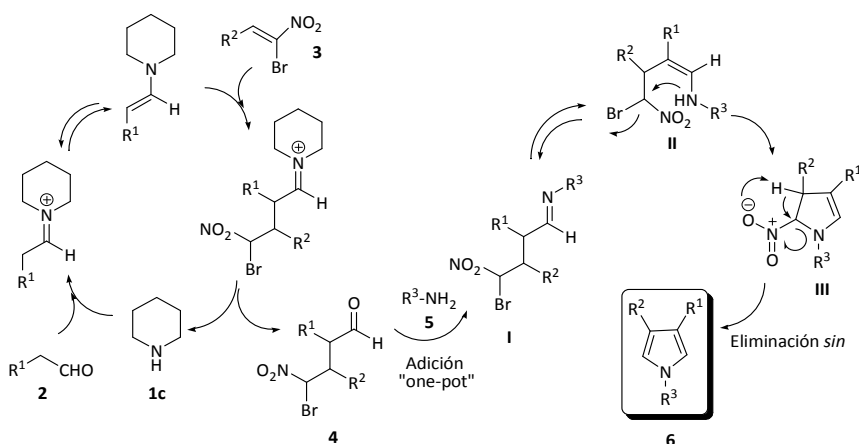
Por otra parte, con el objetivo de evaluar la extensión de la naturaleza modular de este método, se decidió llevar a cabo la síntesis de un bispirrol con diferente sustitución en cada uno de los anillos de pirrol (Esquema 1.7). Para ello, se llevó a cabo la reacción entre el aldehído **2a** y el nitroalqueno **3a** bajo las condiciones óptimas de reacción y, en este caso, el intermedio resultante se trató con la amina **5h**, obteniéndose el pirrol **6o** con buen rendimiento. A continuación, la amina *N*-Boc se desprotegió mediante tratamiento con TFA y la amina resultante fue tratada con el intermedio **4g** (obtenido previamente mediante la reacción entre el aldehído **2c** y el nitroalqueno **3a**), obteniéndose el bispirrol **6p** con un rendimiento global del 36%, demostrándose así la elevada naturaleza modular del método desarrollado.


Esquema 1.7

Aplicación de la metodología en la síntesis de un bispirrol.

1.3.4 Propuesta Mecánica

El mecanismo propuesto para esta reacción se ilustra en el Esquema 1.8. La reacción comienza con la formación de una enamina a partir del aldehído **2**, que puede entonces reaccionar con el nitroalqueno **3**, dando un producto que tras su hidrólisis liberaría el catalizador y proporcionaría el aldehído intermedio **4**. Tras la adición de la amina **5**, ésta condensaría con el intermedio **4** para formar la imina **I**, la cual, tras tautomerizar a la forma enamina, sufriría un ataque intramolecular por el grupo amino, eliminándose el átomo de bromo para formar el intermedio **III**. Este intermedio sufriría entonces una eliminación *syn* del grupo nitro para proporcionar el pirrol final **6**.



Esquema 1.8

Propuesta mecanística.

Por lo tanto, la reacción se iniciaría de forma catalítica, concretamente a través de una catálisis covalente vía enamina y seguidamente procedería en “one-pot” a través de una serie de reacciones en cascada o dominó, pasando por un ataque nucleófilo intramolecular con eliminación de un átomo de bromo y posteriormente por una eliminación *syn* del grupo nitro.

1.4 Conclusiones

De todo lo expuesto en este primer capítulo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1) Se ha desarrollado una nueva metodología organocatalítica para la síntesis de pirroles 3, 4 y *N*-trisustituídos. Este método permite la obtención de los productos evitando la utilización de metales, procesos multietapa o condiciones drásticas de reacción, situándose así en clara ventaja frente a los métodos publicados.
- 2) El método se caracteriza por poseer un elevado carácter modular y resulta aplicable a la síntesis de productos que incluyen pirrol en su estructura e incluso, de pirroles *N*-quirales cuando el pirrol es *N*-sustituído por un aminoácido quiral, el cual no sufre racemización.
- 3) Un posible mecanismo que explicaría la obtención de los productos implica que la reacción tiene lugar mediante catálisis covalente vía enamina, la cual proporcionaría un aducto de Michael 1,4, el cual, tras la adición de una amina en “one pot”, sufriría una serie de reacciones dominó consistentes en un ataque nucleófilo intramolecular, seguido por una eliminación de bromo y una eliminación *syn* del grupo nitro que produce la aromatización del pirrol final.

1.5 Parte Experimental

1.5.1 Materiales

Los reactivos comerciales fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.[®] Los reactivos de partida y los disolventes disponibles comercialmente se utilizaron sin purificación previa. Los bromonitroalquenos **3** fueron sintetizados siguiendo un procedimiento descrito en la bibliografía.⁴³

1.5.2 Técnicas

1.5.2.1 Resonancia Magnética nuclear: RMN

Los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN se han realizado a temperatura ambiente en un equipo *Bruker AV-300* (300 y 75 MHz respectivamente). Los desplazamientos químicos (δ) se dan en ppm, tomando como referencia el valor del disolvente empleado, normalmente, CDCl₃ (7.26 y 77.0 ppm para ¹H-RMN y ¹³C-RMN, respectivamente).

1.5.2.2 Espectrometría de masas: EM/Espectrometría de Masas de Alta Resolución: EMAR

Los espectros de masas y los espectros de masas de alta resolución se han registrado en un espectrómetro *Hewlett-Packard HP-5985* usando técnicas de ionización por impacto electrónico (EI) a 70 eV, bombardeo atómico rápido (FAB) o electrospray (ESI).

1.5.2.3 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

El exceso enantiomérico (ee) del compuesto **5n** se determinó mediante la integración de señales a partir del cromatograma registrado en un cromatógrafo *Agilent 1100 series*, empleando la columna quiral *Chiralpak IA*, y como fase móvil una mezcla hexano/*i*PrOH (90:10). Para la introducción de la muestra en el equipo ésta fue previamente disuelta en MeOH (C= 10 mg/mL).

1.5.2.4 Medida de los puntos de fusión: P.f.

Los puntos de fusión se han determinado en un aparato *GallenKamp* en tubos capilares abiertos y no están corregidos.

1.5.2.5 Medida de la rotación óptica: $[\alpha]_D$

Los valores de rotación óptica se han medido a temperatura ambiente en un polarímetro *Perkin Elmer 241C*. En cada caso se indica el disolvente y la concentración (mg/mL) utilizados.

1.5.3 Métodos generales

1.5.3.1 Seguimiento de las reacciones

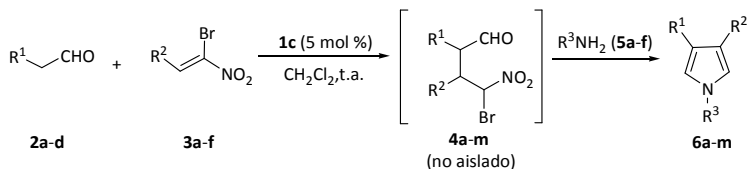
El seguimiento de las reacciones se efectuó mediante cromatografía en capa fina utilizando cromatofolios de aluminio con gel de sílice (*Merck*-60 230-400 mesh) de 0.2 mm de espesor, que se visualizaron con luz ultravioleta ($\lambda = 294\text{nm}$), y se revelaron con ácido fosfomolibdico o permanganato potásico, según el caso.

1.5.3.2 Purificación de los productos

Los productos fueron purificados mediante cromatografía en columna (cromatografía flash, CF), utilizando como fase estacionaria gel de sílice (*Merck*, 230-400 mesh ASTM) y, como fase móvil, un disolvente o mezcla de disolventes, cuya proporción (V/V) se indica en cada caso. La evaporación de los disolventes se llevó a cabo a presión reducida, en rotavapor.

1.5.4 Síntesis de los productos

1.5.4.1 Procedimiento Experimental 1A: Síntesis de los pirroles 6



Esquema 1.9

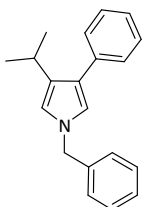
Procedimiento experimental para la síntesis de los pirroles 6.

En un vial se prepara una disolución del correspondiente bromonitroalqueno **3a-f** (0.438 mmol) en CH_2Cl_2 (0.876 mL) y el catalizador **1c** (piperidina, 5 mol%). A esta disolución se le añade el correspondiente aldehído **2a-d** (0.876 mmol), a temperatura ambiente. Tras el consumo total de bromonitroalqueno **3a-f** (monitorizado mediante TLC, normalmente entre 4 y 6 horas), se añade 1.0 mmol de la correspondiente amina **5a-f**. La

reacción se monitoriza mediante TLC y, una vez se ha consumido el intermedio **4a-m**, el disolvente de la reacción se elimina a presión reducida y el crudo se purifica mediante CF (eluyente indicado en cada caso), obteniéndose el producto final **6a-m**, puro.

N-Bencil-3-isopropil-4-fenil-1H-pirrol

6a



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **1A** como un aceite marrón tras purificación mediante CF (50/1 hexano:AcOEt).

Rdto. = 88%.

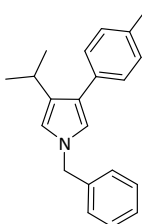
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.61-7.13 (m, 10H), 6.76 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.58 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 5.09 (s, 2H), 3.24 (sp, *J* = 6.7 Hz, 1H), 1.26 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 138.2, 137.1, 130.1, 128.8, 128.4, 128.2, 127.8, 127.4, 125.5, 124.1, 119.7, 117.7, 53.5, 25.7, 24.5.

EMAR (TOF-ESI⁺): [M+H]⁺ calculado para C₂₁H₂₁N: 276.1674; encontrado 276.1759.

N-Bencil-3-isopropil-4-p-tolil-1H-pirrol

6b



El producto fue obtenido siguiendo el procedimiento experimental **1A** como un aceite marrón tras su purificación mediante CF (50/1 hexano:AcOEt). **Rdto.** = 76%.

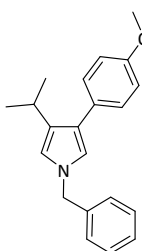
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.67-7.06 (m, 9H), 6.68 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.55 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 5.04 (s, 2H), 3.16 (sp, *J* = 6.8 Hz, 1H), 2.38 (s, 3H), 1.19 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 138.2, 135.0, 134.2, 130.2, 129.1, 128.8, 128.2, 127.7, 127.4, 124.0, 119.6, 117.6, 53.6, 25.2, 24.5, 21.2.

EMAR (TOF-ESI⁺): [M]⁺ calculado para C₂₁H₂₃N: 289.1830; encontrado 289.1834.

N-Bencil-3-isopropil-4-(4-metoxifenil)-1H-pirrol

6c



El producto fue obtenido siguiendo el procedimiento experimental **1A**, utilizando en este caso un 20 mol% de catalizador **1c**. El crudo se purificó mediante CF (50/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite marrón. **Rdto.** = 62%.

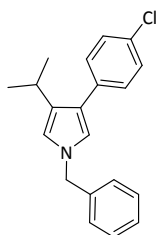
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.56-7.05 (m, 7H), 6.94 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.67 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.56 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 5.05 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.15 (sp, *J* = 6.8 Hz, 1H), 1.21 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 157.8, 138.2, 130.1, 129.7, 129.4, 128.8, 127.7, 127.4, 123.7, 119.3, 117.5, 113.8, 55.3, 53.5, 25.2, 24.4.

EMAR (TOF-EI⁺): [M]⁺ calculado para C₂₁H₂₃NO: 305.1780; encontrado 305.1776.

N-Bencil-3-(4-clorofenil)-4-isopropil-1H-pirrol

6d



El producto fue obtenido siguiendo el procedimiento experimental **1A**. El crudo se purificó mediante CF (50/1 CH₂Cl₂/AcOEt), obteniéndose el producto puro como un aceite marrón. **Rdto.**= 58%.

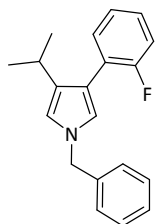
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.47-7.17 (m, 9H), 6.71 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 6.58 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 5.06 (s, 2H), 3.15 (sp, *J* = 6.7 Hz, 1H), 1.22 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 138.0, 135.6, 131.2, 130.1, 129.4, 128.9, 128.5, 127.8, 127.4, 122.9, 119.7, 118.0, 53.6, 25.2, 24.4.

EMAR (TOF-EI⁺): [M]⁺ calculado para C₂₀H₂₀ClN: 309.1284; encontrado 309.1279.

N-Bencil-3-(2-fluorofenil)-4-isopropil-1H-pirrol

6e



El producto fue obtenido siguiendo el procedimiento experimental **1A**. El crudo se purificó mediante CF (50/1 CH₂Cl₂/AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite marrón. **Rdto.**= 57%.

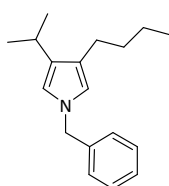
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.42-7.07 (m, 9H), 6.73 (dd, *J* = 2.4, 1.4 Hz, 1H), 6.56 (dd, *J* = 2.4, 0.6 Hz, 1H), 5.06 (s, 2H), 3.01 (sp, *J* = 6.8 Hz, 1H), 1.15 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H).

¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃): 160.3 (*J*_{C-F}= 243.0 Hz, C), 137.9 (C), 131.5 (*J*_{C-F}= 4.2 Hz, C) 130.9 (C), 128.7 (CH), 127.6 (CH), 127.4 (C), 127.3 (C), 127.6 (CH), 123.6 (*J*_{C-F}= 3.8 Hz, CH), 120.9 (*J*_{C-F}= 3.0 Hz, CH), 117.3 (C), 116.7 (CH), 115.5 (*J*_{C-F}= 23.1 Hz, C), 53.5 (CH₂), 25.3 (CH), 24.1 (2xCH₃).

EMAR (TOF-ESI⁺): [M]⁺ calculado para C₂₀H₂₀FN: 293.1580; encontrado 289.1834.

N-Bencil-3-butil-4-isopropil-1H-pirrol

6f



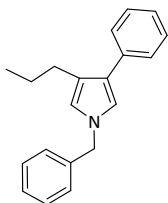
El producto fue obtenido siguiendo el procedimiento experimental **1A**, empleando en este caso, un 20 mol% de catalizador **1c**. El crudo fue purificado mediante CF (50/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite naranja. **Rdto.**= 45%.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.49-7.04 (m, 5H), 6.44 (s, 2H), 4.99 (s, 2H), 2.88 (sp, *J* = 6.8, 1H), 2.46 (c, *J* = 7.8 Hz, 2H), 1.69-1.36 (m, 4H) 1.23 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H), 0.98 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 139.0, 130.6, 128.9, 127.7, 127.4, 123.0, 118.7, 116.8, 53.6, 33.1, 25.5, 25.5, 24.4, 23.2, 14.4.

EMAR (TOF-ESI $^+$): $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}$: 240.1752; encontrado 240.1780.

***N*-Bencil-3-fenil-4-propil-1*H*-pirrol**

6g


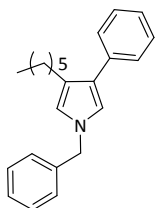
El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **1A**. El crudo se purificó mediante CF (50/1 hexano/AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite marrón. **Rdto.**= 79%.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.55-7.21 (m, 10H), 6.82 (d, J = 2.4 Hz, 1 H), 6.60 (d, J = 2.2 Hz, 1 H), 5.08 (s, 2H), 2.70 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 1.67 (sx, J = 7.5, 2H), 1.03 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 138.2, 136.9, 128.8, 128.4, 127.9, 127.8, 127.3, 125.4, 124.5, 122.8, 119.8, 119.5, 53.5, 28.5, 23.8, 14.4.

EMAR (TOF-EI $^+$): $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}$: 275.1674; encontrado 275.1664.

***N*-Bencil-3-hexil-4-fenil-1*H*-pirrol**

6h


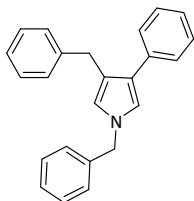
El producto fue obtenido siguiendo el procedimiento experimental **1A**. El crudo se purificó mediante CF (50/1 hexano/AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite marrón. **Rdto.**= 65%.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.56-7.22 (m, 10H), 6.83 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.62 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 5.01 (s, 2H), 2.72 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 1.67 (q, J = 7.4 Hz, 2H), 1.52-1.30 (m, 6H), 0.97 (t, J = 6.7 Hz, 3H).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 138.2, 136.9, 128.8, 128.4, 127.9, 127.7, 127.3, 125.4, 124.5, 123.0, 119.7, 119.5, 53.5, 31.8, 30.6, 29.5, 26.3, 22.8, 14.2.

EMAR (TOF-EI $^+$): $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}$: 317.2143; encontrado 317.2144.

***N*, 3-Dibencil-4-fenil-1*H*-pirrol**

6i


El producto fue obtenido siguiendo el procedimiento experimental **1A**. El crudo se purificó mediante CF (50/1 hexano/AcOEt) obteniéndose el producto como un aceite marrón. **Rdto.**= 61%.

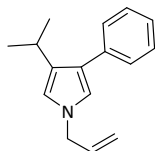
^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.58-7.14 (m, 15H), 6.86 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.43 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 5.05 (s, 2H), 4.07 (s, 2H).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 142.0, 137.9, 136.3, 128.8, 128.7, 128.3, 128.2, 127.8, 127.7, 127.1, 125.6, 125.4, 124.7, 121.2, 121.1, 119.4, 53.4, 32.3.

EMAR (TOF-EI $^+$): $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}$: 323.1674, encontrado 323.1667.

N-Alil-4-fenil-3-isopropil-1H-pirrol

6j



El producto fue obtenido siguiendo el procedimiento experimental **1A**. El crudo se purificó mediante CF (50/1 hexano:AcOEt) obteniéndose el producto como un aceite marrón. **Rdto.** = 90%.

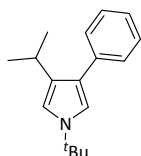
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.47-7.15 (m, 5H), 6.68 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.53 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.12-5.93 (m, 1H), 5.27 (s, 1H), 5.22 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.48 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.24-3.09 (m, 1H) 1.20 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H).

¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃): δ 137.4, 134.6, 130.2, 128.6, 128.6, 128.5, 125.7, 119.4, 118.1, 117.4, 52.6, 25.4 24.7.

EMAR (TOF-EI⁺): [M]⁺ calculado para C₁₆H₁₉N: 225.1517, encontrado 225.1520.

N-terc-Butil-4-fenil-3-isopropil-1H-pirrol

6k



El producto fue obtenido siguiendo el procedimiento experimental **1A**. El crudo se purificó mediante CF (50/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite marrón. **Rdto.** > 99%.

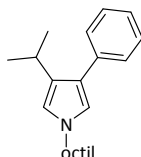
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.67-7.14 (m, 5H), 6.86 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.71 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.22 (sp, *J* = 6.8 Hz, 1H), 1.59 (s, 9H), 1.24 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 137.6, 128.9, 128.3, 128.1, 125.3, 122.9, 116.3, 114.1, 54.7, 30.8, 25.2, 24.4.

EMAR (TOF-EI⁺): [M]⁺ calculado para C₁₇H₂₃N: 241.1830, encontrado 241.1828.

4-Fenil-3-isopropil-N-1H-pirrol

6l



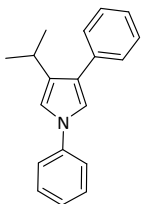
El producto fue obtenido siguiendo el procedimiento experimental **1A**. El crudo se purificó mediante CF (50/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite marrón. **Rdto.** = 55%.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.47-7.17 (m, 5H), 6.67 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.51 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 3.84 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.16 (sext, *J* = 6.8 Hz, 1H),

1.87-1.75 (m, 2H), 1.39-1.26 (m, 12 H), 1.19 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H), 0.91 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H).

¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃): δ 137.6, 129.7, 128.6, 128.5, 125.6, 123.6, 119.2, 117.3, 50.1, 32.1, 31.8, 29.5 (2xCH₂), 27.2, 25.4, 24.7, 23.0, 14.4.

EMAR (TOF-EI⁺): [M]⁺ calculado para C₂₁H₃₁N: 297.2457, encontrado 297.2447.

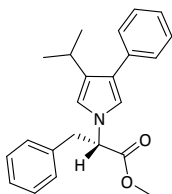
3-Isopropil-N,4-difenil-1H-pirrol**6m**

El producto fue obtenido según el procedimiento experimental **1A**. El crudo se purificó mediante CF (50/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite marrón. **Rdto.** = 52%.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.53-7.35 (m, 7H), 7.31-7.19 (m, 3H), 7.07 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 3.19 (sp, *J* = 6.7 Hz, 1H), 1.24 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 140.9, 136.8, 132.5, 129.9, 128.7, 128.6, 126.7, 126.3, 125.6, 120.2, 117.6, 115.8, 25.4, 24.5.

EMAR (FB⁺): [M⁺] calculado para C₁₉H₁₉N: 261.1517; encontrado 261.1523.

(S)-2-(4-Fenil-3-isopropil-1H-pirrol-1-il)-3-fenilpropanoato de metilo**6n**

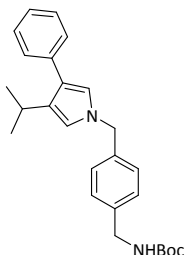
El producto fue obtenido siguiendo el procedimiento experimental **1A**, a partir del aldehído **2a**, el bromonitroalqueno **3a** y el metil éster del aminoácido *L*-fenilalanina (**5g**). El crudo se purificó mediante CF (50/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite marrón. El exceso enantiomérico (ee) fue determinado mediante HPLC (columna Chiralpak IA, hexano/*i*PrOH (90:10), flujo 0.5 mL/min, τ_{mayor} = 20.5 min,

τ_{menor} = 13.5 min (r.e. = 98:2). **Rdto.** = 72%. **ee** = 96%. [α]_D²⁵ = -36.8 (*c* = 0.5, CHCl₃).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.46-7.03 (m, 10H), 6.76 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.59 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 4.72 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.42-3.36 (m, 2H), 3.15 (sp, *J* = 6.8 Hz, 1H), 1.19 (dd, *J* = 5.2 Hz, 6H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 170.8, 137.1, 136.6, 130.4, 129.2, 128.8, 128.5, 128.5, 127.3, 125.8, 124.6, 118.7, 116.9, 63.9, 52.7, 40.1, 25.3, 24.6, 24.5.

EMAR (TOF-EI⁺): [M+H]⁺ calculado para C₂₃H₂₅NO₂: 348.1885, encontrado 348.1968.

4-[(4-Fenil-3-isopropil-1H-pirrol-1-il)metil]bencilcarbamato de terc-butilo**6o**

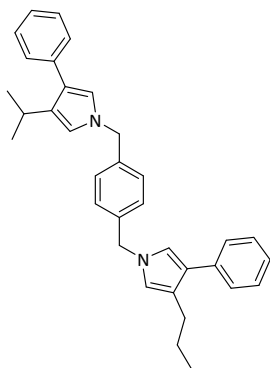
El producto se obtuvo según el procedimiento experimental **1A**, a partir del aldehído **2a**, el bromonitroalqueno **3a** y la amina **5h**. El crudo se purificó mediante CF (50/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite incoloro. **Rdto.** = 61%.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.51-7.12 (m, 9 H), 6.70 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.57 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 5.03 (s, 2H), 4.97 (bs, 1H), 4.33 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.20 (sp, *J* = 6.8 Hz, 1H), 1.51 (s, 9H), 1.22 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 156.2, 138.8, 137.3, 130.3, 128.5, 128.4, 128.0, 127.8, 125.7, 124.3, 119.8, 117.8, 79.8, 53.4, 44.6, 28.7, 25.3, 24.6.

EMAR (TOF-EI⁺): [M+H]⁺ calculado para C₂₆H₃₂N₂O₂: 405.2464 encontrado 405.2533.

***N*-(4-((3-Fenil-4-propil-1H-pirrol-1-il)metil)bencil)-4-fenil-3-isopropil-1H-pirrol 6p**



Sobre un vial que contiene el compuesto **6o** (0.813 mmol) en CH₂Cl₂ (2 mL), se añade ácido trifluoroacético (10 equiv.) a temperatura ambiente. Tras el consumo total del compuesto **6o** (monitorizado por ¹H-RMN), la amina se purifica mediante cromatografía en columna SCX, de intercambio iónico. La amina resultante es añadida directamente sobre el intermedio recién preparado **4g** (0.2 mmol) de acuerdo con el procedimiento experimental **1A**. Tras el consumo completo de **4g** (monitorizado mediante TLC), el disolvente de la reacción se elimina bajo presión reducida y el crudo se purifica

mediante CF (15/1 hexano: AcOEt), obteniéndose el producto **6p** como un aceite naranja.

Rdto.= 36%.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.47-7.31 (m, 10H), 7.16 (s, 4H), 6.75 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.69 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.59-6.46 (m, 2H), 5.03 (s, 4H) 3.17 (sp, *J* = 6.7 Hz, 1H), 2.61 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 1.59 (sx, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.19 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H), 0.96 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃): δ 138.0, 137.3, 137.0, 130.5, 128.6, 128.5, 128.1, 127.9, 127.8, 125.8, 125.7, 124.8, 124.5, 123.1, 120.0, 119.9, 119.7, 117.9, 53.4, 54.0, 28.7, 25.4, 24.7, 24.0, 14.6.

EMAR (TOF-EI⁺): [M+H]⁺ calculado para C₃₄H₃₆N₂: 472.2878, encontrado 472.2887.

1.6 Bibliografía

⁸ a) Sundburg, R.J. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*; Katritzky, A. R., Rees, C. W., Scriven, E.F.F., Eds.; Pergamon Press: Oxford, **1996**; Vol. 2, pág. 119; b) *Heterocycles in Natural Product Synthesis* (Eds.: K.C. Majumdar, S.K. Chattopadhyay, Wiley-VCH, Weinheim, págs. 187-220, **2011**.

⁹

¹⁰ a) A. Kros, S. W. F. M. van Hövel, R. J. M. Nolte, N. A. J. M. Sommerdijk, *Sens. Actuators, B*, **2001**, 80, 229; b) S. Hamilton, M. J. Hepher, J. Sommerville, *Sens. Actuators, B*, **2005**, 107, 424; c) A. Loudet, K. Burgess, *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 4891.

¹¹ K.I. Lazerges, S. Chane-Ching, S. Aeiya, S. Chelli, B. Peppin-Donnat, M. Billon, L. Lombard, F. Maurel, M. Jouini, *J. Solid State Electrochem.* **2009**, 13, 231.

¹² A. R. Battersby, *Nat. Prod. Rep.*, **2000**, 17, 507.

¹³ A. E. Ondrus, M. Movassaghi, *Chem. Commun.* **2009**, 4151.

¹⁴ a) N. R. Williamson, P. C. Fineran, F. J. Leeper and G. P. Salmond, *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, 4, 887; b) R. Pandey, R. Chander, K.B. Sainis, *Curr Pharm Des.* **2009**, 15, 732.

¹⁵ C. Teixeira, F. Barbault, J. Rebehmed, K. Liu, L. Xie, H. Lu, S. Jiang, B. Fan, F. Maurel, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 3039.

¹⁶ a) M. Biava, G.C. Porretta, D. Deidda, R. Pompei, A. Tafic, F. Manettic, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 1453; b) M. Protopopova, E. Bogatcheva, B. Nikonenko, S. Hundert, L. Einck, C. A. Nacy, *Med. Chem.* **2007**, 3, 301.

¹⁷ D. P. O'Malley, K. Li, M. Maue, A.L. Zografos, P.S. Baran *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 4762.

¹⁸ C. C. Hughes, A. Prieto-Davo, P. R. Jensen, W. Fenical *Org. Lett.*, **2008**, 10, 629.

¹⁹ D. L. Boger, C. W. Boyce, M. A. Labroli, C. A. Sehon, Q. Jin, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 54.

²⁰ B. A. Trofimov, A. I. Mikhaleva, E. Y. Schmidt, L. N. Sobenina, *Chemistry of Pyrroles*, Ed. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, **2015**, pág.XI.

²¹ A. Hantzsch, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1890**, 3, 1474.

²² L. Knorr, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1884**, 17, 1635.

²³ C. Paal, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1885**, 18, 367.

²⁴ E. K. Woller, V. V. Smirnov, S. G. DiMaggio, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 5706; b) S.L. Buchwald, M.W. Wannamaker, B.T. Watson, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 776.

²⁵ H. Naka, D. Koseki, Y. Kondo, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, 350, 1901.

- ²⁶ a) H. Shiraishi, T. Nishitani, S. Sakaguchi, Y. Ishii, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 13957; b) M. Yasuda, J. Morimoto, I. Shibata, A. Baba, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3265; c) E. J. Roskamp, P. S. Dragovich, J. B. Hartung Jr., S. F. Pedersen, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4736; d) B. Chatopadhyay, V. Gevorgyan, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3746.
- ²⁷ R. Robles-Machín, A. López-Pérez, M. González-Esguevillas, J. Adrio, J.C. Carretero, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 9864.
- ²⁸ H. Sorek, A. Rudi, M. Aknin, E.M. Gaydou, Y. Kashman, *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 456.
- ²⁹ G. Dannhardt, W. Kiefer, G. Krämer, S. Maehrlein, U. Nowe, U. Fiebich, *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 499.
- ³⁰ a) A. Tafi, t. Anastassopoulou, M. Botta, F. Corelli, S. Massa, M. Artico, R. Costi, R. Di Santo, R. Ragno, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1227; b) M. Botta, F. Corelli, F. Manetti, C. Mugnaini, A. Tafi, *Pure Appl. Chem.* **2011**, *73*, 1477; c) A. Tafi, R. Costi, M. Botta, R. Di Santo, F. Corelli, S. Massa, A. Ciacci, F. Manetti, M. Artico, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2720; d) R. di Santo, A. Tafi, R. Costi, M. Botta, M. Artico, F. Corelli, M. Forte, F. Caporuscio, L. Angiolella, A.T. Palamara, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5140.
- ³¹ N. J. L. Guernion and W. Hayes, *Curr. Org. Chem.* **2004**, *8*, 637.
- ³² G. Zotti, S. Zecchin, G. Schiavon, B. Vercelli, A. Berlin, S. Grimoldi, *Macromol. Chem. Phys.* **2004**, *205*, 2026.
- ³³ N. Ono, H. Miyagawa, T. Ueta, T. Ogawa, H. Tani, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1998**, 1595.
- ³⁴ G. Sönmez, I. Schwendeman, P. Schottland, K. Zong and J. R. Reynolds, *Macromolecules* **2003**, *36*, 639.
- ³⁵ A. R. Battersby, C. J. R. Fookes, G. W. J. Matcham., E. McDonald, *Nature* **1980**, *285*, 17.
- ³⁶ a) D. Dauzonne, R. Royer, *Synthesis* **1987**, 1020; b) D. Dauzonne, H. Josien, P. Demerseman, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 7359; c) D. Dauzonne, P. Demerseman, *Synthesis* **1990**, 67; d) R. G. Soengas, R. C. Acúrcio, A. M. S. Silva, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 6339.
- ³⁷ a) M. M. Campbell, N. Cosford, Z. Li, M. Sainsbury, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 1117; b) S. E. Denmark, V. Guagnano, J. A. Dixon, A. J. Stolle, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4610; c) S. H. McCooey, T. McCabe, S. J. Connon, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7494; d) R. Muruganantham, S. M. Mobin, I. N. N. Namboothiri *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1125; e) M. Ganesh; I. N. N. Namboothiri, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11973.
- ³⁸ M. Rueping, A. Parra, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5281.
- ³⁹ M. Rueping, A. Parra, U. Uria, F. Besselièvre, E. Merino, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5680.

⁴⁰ F. Li-Ping, L. Ping, L. Sin-Sheng, X. Dong-Cheng, G. Meng Meng, Z. Wei-Dong, X. Jian-From, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 8716; b) X. Jian-Wu, L. Ping, W. Ting, Z. Fei-Ting, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 2379.

⁴¹ Para ejemplos recientes, véase, p.ej.: a) O. García Mancheño, P. Tangen, R. Rohlmann, R. Fröhlich, J. Alemán, *J. Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 984; b) J. Alemán, A. Núñez, L. Marzo, V. Marcos, C. Alvarado, J. L. García Ruano, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 9453; c) J. Alemán, V. Marcos, L. Marzo, J. L. García Ruano, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *23*, 4482; d) J. Alemán, V. del Solar, C. Martín-Santos, L. Cubo, C. Navarro, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7287.

⁴² P. D'Arrigo, D. Arosio, L. Cerioli, D. Moscatelli, S. Servi, F. Viani, D. Tessaro, *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 851.

⁴³ a) R. R. Dauzonne *Synthesis*, **1987**, 1021; b) D. Dauzonne, H. Josien, P. Demerseman *Tetrahedron* **1990**, *21*, 7359; c) D. Dauzonne, P. Demerseman *Synthesis*, **1990**, 67.

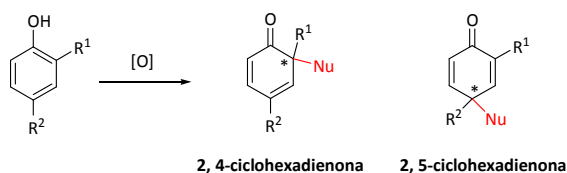
Capítulo 2

Síntesis enantioselectiva de derivados tricíclicos a través de un proceso de desaromatización y desimetrización organocatalítica vía dienamina

La transformación de compuestos aromáticos en moléculas complejas a través de reacciones de desaromatización, es una estrategia fundamental en la síntesis de productos naturales. Sin embargo, el control de la estereoquímica en este proceso es limitado. Como aportación a esta estrategia, en este capítulo se presenta la síntesis enantioselectiva de derivados tricíclicos presentes en un gran número de productos naturales y bioactivos, a través de una secuencia en etapas desaromatización-desimetrización organocatalítica, mediante catálisis vía dienamina.

2.1 Introducción y Antecedentes

Debido a las extensas posibilidades de funcionalización y a su variada reactividad, los sistemas aromáticos constituyen atractivos materiales de partida para la construcción de moléculas complejas.⁴⁴ Dentro de su reactividad, las reacciones de desaromatización representan una importante transformación en síntesis orgánica, ya que permiten la obtención de compuestos tridimensionales a partir de sistemas planos muy fácilmente accesibles, como son los sistemas aromáticos y, por lo tanto, juegan un papel fundamental en la síntesis de productos naturales.⁴⁵ Concretamente, entre los diferentes tipos de reacciones de desaromatización, la desaromatización oxidativa de arenos ricos en electrones, como es el caso de los fenoles, ha sido extensamente estudiada por distintos grupos de investigación.⁴⁶ La desaromatización de un fenol provoca un profundo cambio en su reactividad, la cual pasa de ser esencialmente nucleófila, a electrófila, al ser transformado en 2,4- o 2,5-ciclohexadienonas (Esquema 2.1), proceso que supone la etapa clave en la síntesis de diversos productos naturales.⁴⁷ La ciclohexadienona es susceptible de sufrir un ataque nucleófilo de manera regioselectiva y, además, la enona conjugada que se genera es ideal para participar en procesos de cicloadición (por ejemplo, reacciones de Diels-Alder) y de adición conjugada (por ejemplo reacciones de Michael) lo que permite su posterior transformación en derivados más complejos. Por otra parte, en el proceso de desaromatización del fenol, se genera un centro estereogénico a partir de un átomo de carbono con hibridación sp^2 y por lo tanto, la ciclohexadienona resultante es susceptible de presentar quiralidad en su estructura.

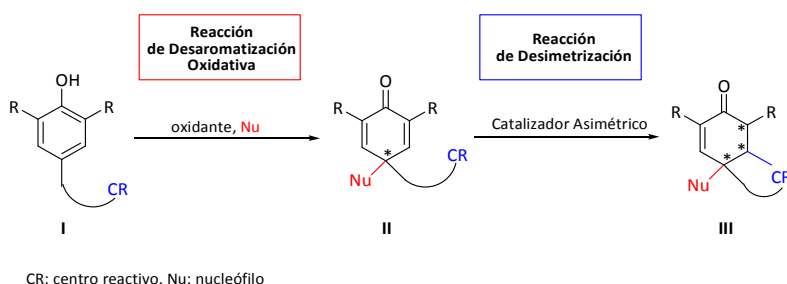


Esquema 2.1

Desaromatización oxidativa de fenoles.

A pesar de la existencia de numerosos métodos para la desaromatización de fenoles⁴⁸ (algunos de ellos estereoselectivos, basados principalmente en el uso de auxiliares quirales), la superación de la elevada barrera energética que supone la ruptura de la aromaticidad implica, en la mayor parte de los casos, el uso de duras condiciones de reacción que hacen muy difícil el control de la regio y la estereoselectividad en este proceso, obteniéndose normalmente ciclohexadienonas racémicas o, compuestos *meso* en

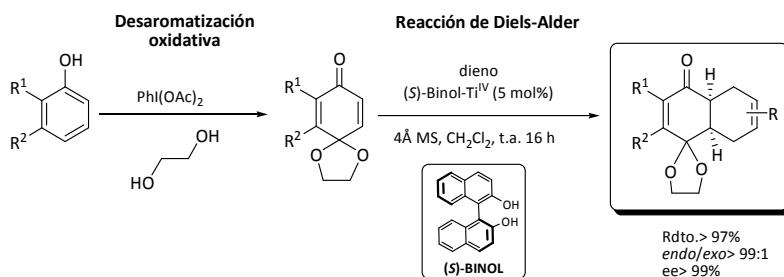
el caso de que el fenol de partida sea simétrico. En contraposición a las reacciones de desaromatización, la desimetrización de compuestos *meso* si proporciona productos enantioenriquecidos, por lo que desde hace algunos años se ha desarrollado una nueva estrategia para la síntesis de productos enantioenriquecidos a partir de compuestos aromáticos sencillos. Dicha estrategia, representada en el Esquema 2.2, consiste en llevar a cabo en primer lugar, una desaromatización oxidativa sobre un fenol simétrico, el cual contiene en su posición *para* un centro reactivo capaz producir posteriormente la desimetrización de la ciclohexadienona generada, de forma intramolecular, mediante la utilización de un catalizador asimétrico. Puesto que se parte de un fenol simétrico, la ciclohexadienona generada (II) es un compuesto *meso*, y por lo tanto, durante su desimetrización por acción del catalizador se generan dos o más centros estereogénicos.



Esquema 2.2

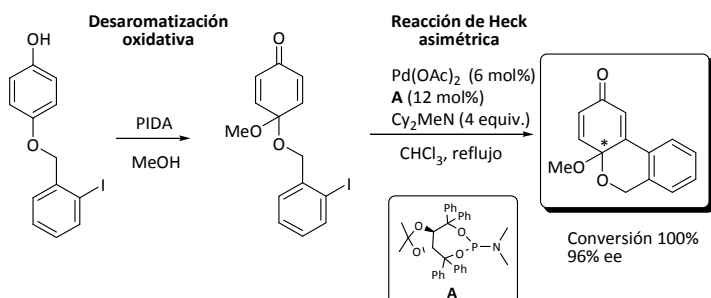
Estrategia de desaromatización-desimetrización para la síntesis de moléculas complejas.

El primer ejemplo en el que se aplica esta estrategia fue publicado por Breuning y Corey en el año 2001,⁴⁹ quienes consiguieron oxidar distintos fenoles con PIDA en presencia de etilenglicol y seguidamente llevar a cabo una reacción de Diels-Alder empleando un catalizador quiral de Ti(IV). De esta forma, pudieron obtener diversos productos con utilidad sintética, con rendimientos satisfactorios, excelente enantioselectividad y buena selectividad *endo/exo* (Esquema 2.3).

**Esquema 2.3**

Desaromatización-desimetrización vía Diels-Alder desarrollada por Corey y colaboradores.⁴⁹

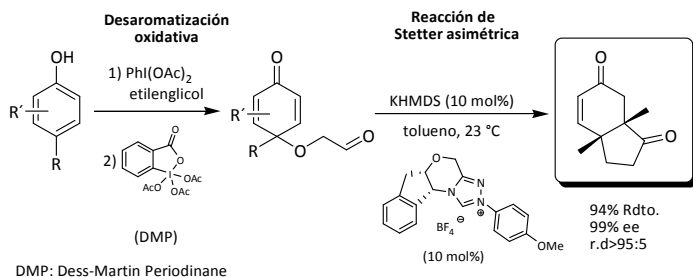
Posteriormente, en el año 2002, el grupo de Feringa llevó a cabo una reacción intramolecular de Heck utilizando catálisis de paladio y un derivado de TADDOL (**A**, Esquema 1.4) como ligando quiral,⁵⁰ logrando una dienona con un centro quiral y un exceso enantiomérico del 96% (Esquema 2.4).

**Esquema 2.4**

Desaromatización-desimetrización vía Heck publicada por Feringa y colaboradores.⁵⁰

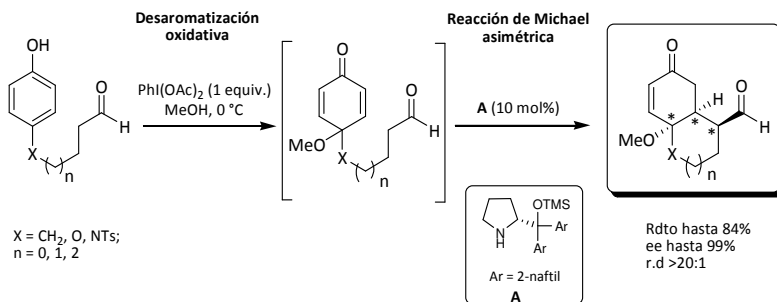
En los dos ejemplos anteriores la desimetrización es llevada a cabo vía catálisis metálica, sin embargo, la presencia de una cetona α,β -insaturada convierte a la ciclohexadienona en un excelente sustrato para llevar a cabo transformaciones organocatalíticas, mediante las cuales obtener productos quirales evitando el uso de metales.

Uno de los primeros ejemplos de desaromatización-desimetrización organocatalítica, fue publicado por el grupo de Rovis en 2006⁵¹ (Esquema 2.5). En este trabajo se desarrolla una reacción intramolecular de Stetter catalizada por carbenos, previa desaromatización oxidativa de fenoles, obteniendo enonas con buenos rendimientos y excelentes excesos enantioméricos.

**Esquema 2.5**

Desaromatización-desimetrización organocatalítica vía Stetter.

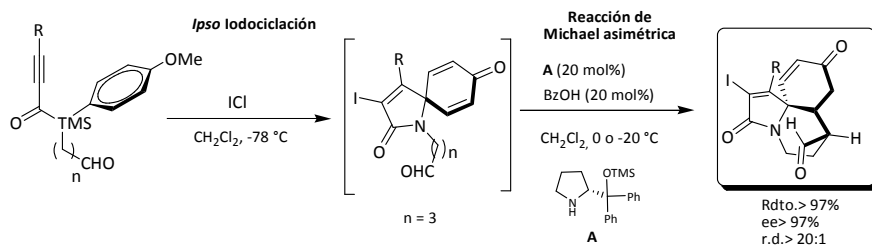
Más tarde, en 2008 Gaunt llevó a cabo, mediante un proceso en one-pot, la desaromatización oxidativa de fenoles seguida por una reacción asimétrica de Michael, catalizada por un derivado de prolinol⁵² (**A**, Esquema 2.6). Mediante este elegante procedimiento, a partir de fenoles *para*-sustituídos, se consigue obtener moléculas policíclicas con tres centros estereogénicos contiguos, sin disminuir la enantio o la diastereoselectividad con respecto al proceso en dos etapas.

**Esquema 2.6**

Desaromatización-desimetrización organocatalítica vía reacción de Michael.

Después, Larock llevó a cabo la *ipso* iodociclación de alquenilarenos en presencia de ICl seguida por una adición asimétrica de Michael catalizada por otro derivado de prolinol,⁵³ (**A**, Esquema 2.7) obteniendo ciclohexadienonas espirocíclicas iodosustituídas. De esta forma se obteniéndose moléculas tricíclicas con un centro cuaternario con excelente diastereoselectividad y buena enantioselectividad. Sin embargo, la enantioselectividad de este proceso es baja en el caso de la formación de anillos de cinco miembros durante la etapa de la adición de Michael. Inspirado en los trabajos anteriores, You llevó a cabo una reacción intramolecular de Stetter sobre los productos obtenidos

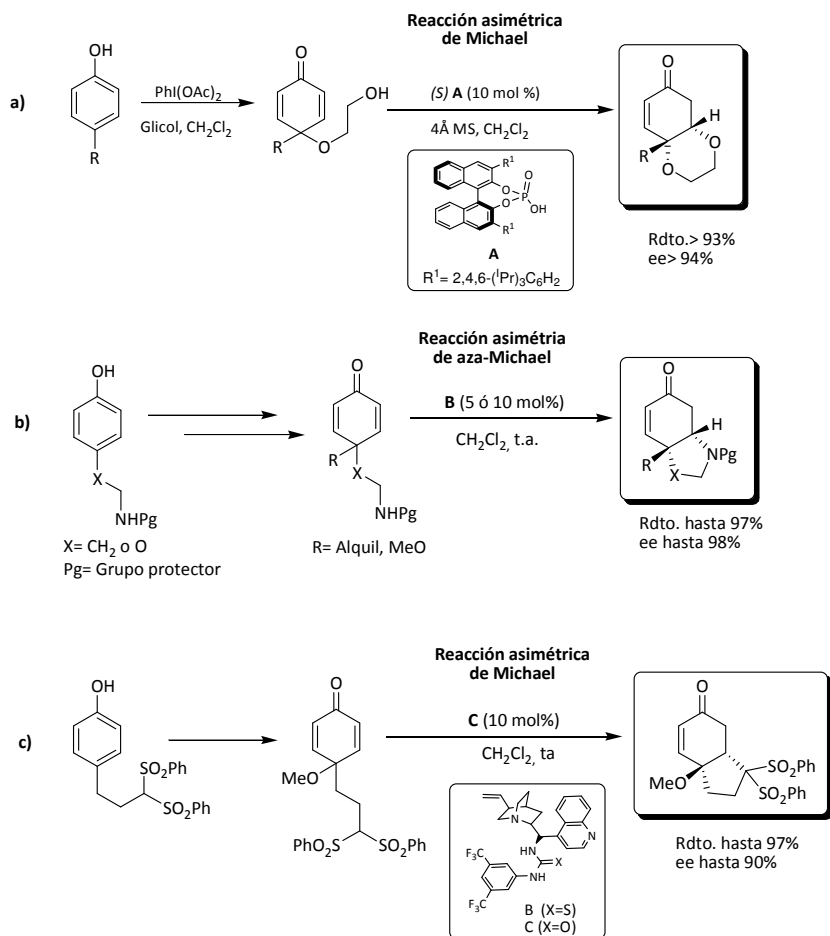
mediante la *ipso* iodociclación de Larock, utilizando como catalizador una sal de triazolio derivada del canfor.⁵⁴



Esquema 2.7

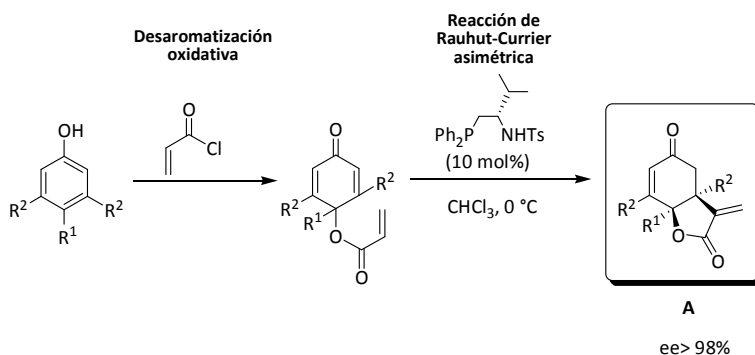
Ipsa Iodociclación-desimetrización organocatalítica vía reacción de Michael.

Más recientemente el grupo de You ha publicado varios ejemplos de reacciones en las que mediante la utilización de distintos organocatalizadores asimétricos, consiguió llevar a cabo reacciones asimétricas de Michael intramoleculares, sobre los productos de desaromatización oxidativa de fenoles. Así, mediante catálisis con un ácido fosfórico quiral (**A**, Esquema 2.8) llevó a cabo una reacción oxa-Michael en la que se obtienen 1,4-dioxanos enantioméricamente enriquecidos,⁵⁵ proceso que constituye la etapa clave en la síntesis total de cleroindicinas C, D y F. Utilizando un catalizador de tiourea (**B**, Esquema 2.8), consiguió sintetizar biciclos de pirrolidina y morfolina con excelentes rendimientos y enantioselectividades⁵⁶ (ecuación b, Esquema 2.8). También ha estudiado este tipo de desimetrización empleando un catalizador de urea⁵⁷ (**C**, Esquema 2.8), aunque en este caso es necesaria la presencia de grupos fuertemente atractores de electrones (como bisfenilsulfonas) en el sustrato para conseguir una buena enantioselectividad (ecuación c, esquema 2.8).

**Esquema 2.8**

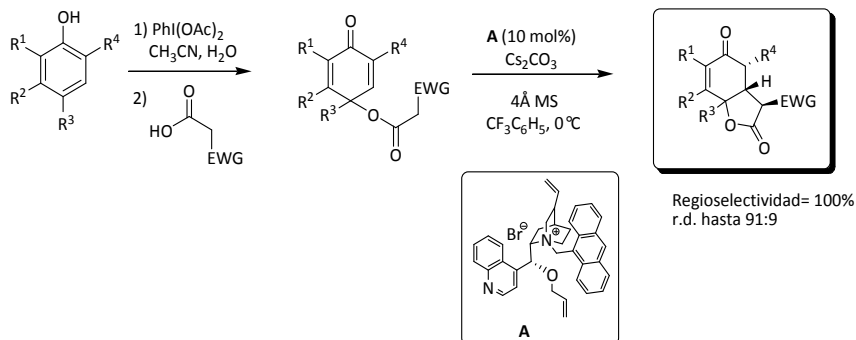
Ejemplos de desaromatización-desimetrización organocatalítica vía adición de Michael.

Por otra parte, Enders y Sasai lograron acoplar una reacción organocatalítica de Rauhut-Currier a la desaromatización oxidativa de fenoles simétricos,⁵⁸ obteniendo derivados de α -alquiliden- γ -butirolactonas (**A**, Esquema 2.9) con una alta enantioselectividad.


Esquema 2.9

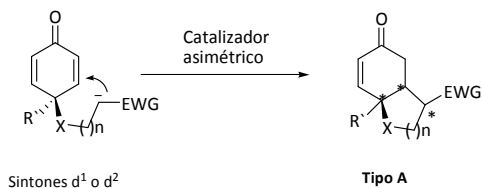
Desaromatización-desimetrización organocatalítica vía reacción de Rauhut-Currier.

Más tarde, Harned llevó a cabo una reacción de desaromatización oxidativa de fenoles seguida por una reacción asimétrica de Michael,⁵⁹ empleando para ello un 10 mol% de un catalizador de transferencia de fase derivado de chincona (**A**, Esquema 2.10), obteniendo derivados bicíclicos con buena regio y enantioselectividad.


Esquema 2.10

Desaromatización oxidativa-desimetrización vía reacción de Michael.

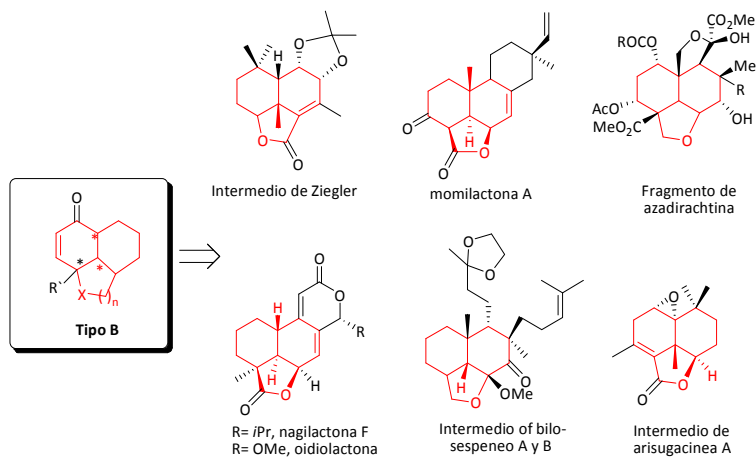
Si se consideran los ejemplos citados, la estrategia desaromatización-desimetrización organocatalítica es una reacción de desaromatización asimétrica por etapas, y permite la obtención de estructuras tridimensionales complejas, de manera enantioselectiva, a partir de materiales de partida fácilmente accesibles, como son los fenoles, lo que resulta muy interesante en el ámbito de la síntesis de productos naturales. Normalmente la desimetrización se produce como consecuencia del ataque de sintones d¹ o d² sobre la cetona α,β-insaturada de la ciclohexadienona y, por lo tanto, los productos obtenidos presentan estructuras bicíclicas tipo **A** (Figura 2.1).

**Figura 2.1**

Derivados bicíclicos quirales tipo **A**, obtenidos mediante los métodos actuales de desaromatización-desimetrización.

Sin embargo diferentes estructuras quirales más complejas, como las estructuras tricíclicas tipo **B** (Figura 2.2) se encuentran también presentes en diversos productos naturales, formando parte de moléculas como el intermedio de Ziegler,⁶⁰ la momilactona A,⁶¹ la azadirachtina,⁶² nagilactona y oidiolactona,⁶³ y han sido también utilizadas en la síntesis de los bilosespensos A y B⁶⁴ y de la arisugacina A^{65,66}. Por lo tanto, debido a las diversas actividades biológicas presentadas por estos productos se hace necesaria la búsqueda de métodos directos y rápidos para su síntesis.

En consecuencia, en este capítulo se plantea el desarrollo de un método de síntesis para la obtención de derivados policíclicos quirales más complejos, como son los derivados tricíclicos tipo **B** (Figura 2.2).

**Figura 2.2**

Derivados tricíclicos quirales tipo **B**, presentes en diversos productos naturales.

2.2 Objetivos

La estrategia desaromatización oxidativa-desimetrización organocatalítica ha sido explorada únicamente para la síntesis de derivados bicíclicos quirales tipo **A** (Figura 2.1). Dada la potencial utilidad de esta metodología en la síntesis de productos naturales, la presencia de estructuras tricíclicas quirales tipo **B** (Figura 2.3), en distintos productos bioactivos, nos llevó a plantearnos la síntesis enantioselectiva de dichos derivados tricíclicos utilizando esta nueva metodología.

La elección de los materiales de partida se realizó a partir de un sencillo análisis retrosintético de los derivados tricíclicos **B** (Figura 1.3). La primera desconexión provendría de una condensación aldólica intramolecular a partir de **C**. Una segunda desconexión procedería de la activación de la posición alílica del aldehído α,β -insaturado **D** mediante catálisis vía dienamina, posición que atacaría a la quinona a través de una reacción de Michael intramolecular, produciendo su desimetrización. También podría postularse que la segunda desconexión procediera de una reacción de cicloadición [4+2] intramolecular de la especie **D**. Los materiales de partida **D** se obtendrían mediante distintos procedimientos a partir de los fenoles **E** apropiados, elegidos en función del resto R deseado, la longitud de la cadena alquílica, n, y el conector utilizado, X (X= CH₂, O, N).

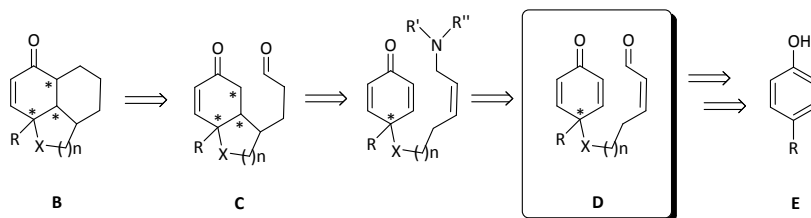


Figura 2.3

Análisis retrosintético de las estructuras tricíclicas tipo **B**.

Por tanto, los objetivos de este capítulo pueden concretarse en los siguientes:

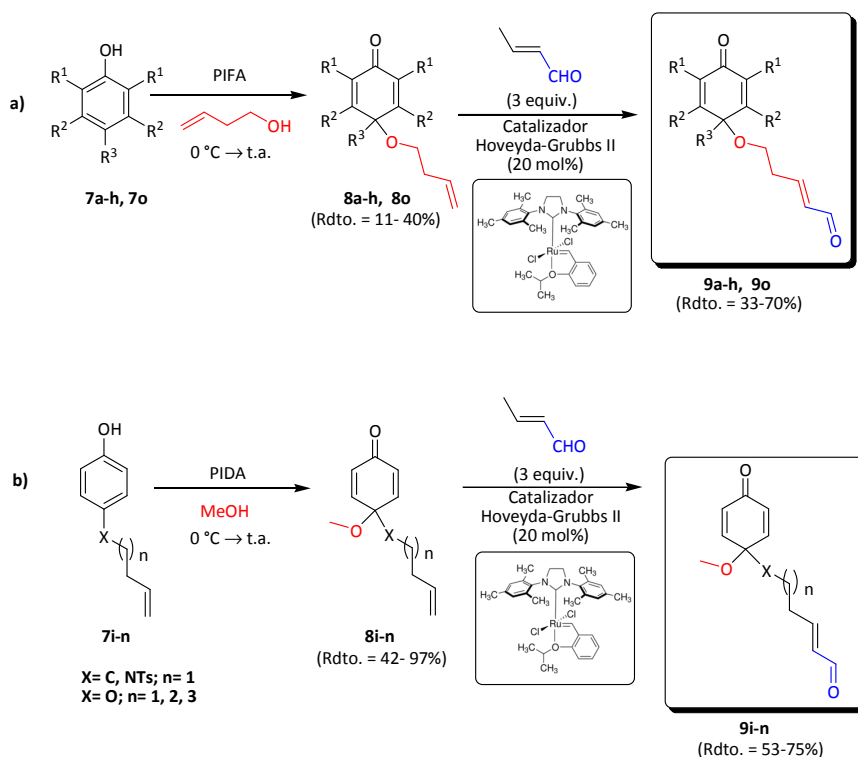
- 1) Síntesis de los materiales de partida **D**, a partir de fenoles simétricos.
- 2) Búsqueda de las condiciones óptimas para la reacción de desimetrización enantioselectiva, en cuanto a la naturaleza y carga del catalizador, tipo de disolvente, temperatura y tiempo de reacción.

- 3) Estudio del alcance de la reacción mediante el cual se pueda establecer un criterio acerca de la utilidad del método para la síntesis de productos más complejos.
- 4) Estudio del mecanismo de la reacción mediante cálculos DFT.

2.3 Resultados y Discusión

2.3.1 Síntesis de materiales de partida

Los materiales de partida **D** (ciclohexadienonas **9a-o**) fueron sintetizados a partir de los fenoles correspondientes (**7a-o**) a través de una secuencia en dos etapas, que pasa por una primera reacción de desaromatización oxidativa, en la que se emplean reactivos oxidantes de yodo hipervalente (PIDA o PIFA) y posteriormente, por una reacción de metátesis en presencia del catalizador de Grubbs de segunda generación (Esquema 2.11).



Esquema 2.11

Secuencia general para la síntesis de las ciclohexadienonas de partida, **D**, a partir de fenoles **7**.

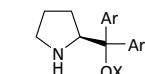
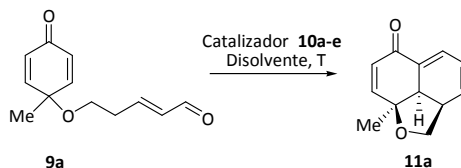
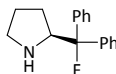
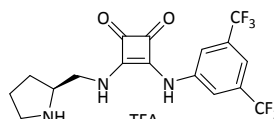
Los fenoles comerciales **7a-h** y **7o** fueron oxidados con PIFA, empleando 3-buten-1-ol como nucleófilo (ecuación a, Esquema 2.11), mientras que los fenoles no comerciales **7i-n**, se oxidaron con PIDA utilizando MeOH como nucleófilo (ecuación b, Esquema 2.11). De esta manera se pudieron obtener diversas ciclohexadienonas intermedias **8a-o**, sustituidas en la posición *para* con diferentes nucleófilos y restos alquénlicos.

Posteriormente el resto alquenílico fue transformado en el aldehído correspondiente mediante una reacción de metátesis con crotonaldehído en presencia del catalizador de Hoveyda-Grubbs II, dando lugar a los materiales de partida **9a-o**. Los fenoles no disponibles comercialmente **7i**, **7k** y **7m-n**, y **7l**, fueron sintetizados mediante distintos procedimientos (véanse los procedimientos experimentales **2A**, **2B**, y **2C**, respectivamente).

2.3.2 Optimización de la reacción

La búsqueda de las condiciones óptimas para llevar a cabo la síntesis enantioselectiva de los derivados tricíclicos **B**, partiendo de las ciclohexadienonas simétricas **D** (véase Figura 2.3), se realizó sobre la ciclohexadienona **9a**, según se indica en la Tabla 2.1.

En primer lugar se examinó la reactividad de diferentes catalizadores en CH_2Cl_2 , a temperatura ambiente. Para nuestro asombro, el catalizador **10a** proporcionó un único diastereoisómero con conversión completa y un ee del 90% en una hora (entrada 1, Tabla 2.1). Se obtuvieron resultados similares con los catalizadores **10b** y **10d** (entradas 2 y 4), no produciéndose la reacción en el caso del catalizador **10c** o de la escuaramida **10e** (entradas 3 y 5). A continuación, con los dos mejores catalizadores (**10a** y **10b**) se procedió a mejorar los resultados de la reacción. Para ello, inicialmente se evaluó la reacción con el catalizador **10b** en presencia de distintos disolventes (entradas 6 y 7, Tabla 2.1), obteniéndose similares excesos enantioméricos pero con menores conversiones. Por lo tanto, puesto que el catalizador **10a** dio similares resultados, se evaluó la variación del disolvente en presencia de este catalizador, obteniéndose los mejores resultados en CH_2Cl_2 y CHCl_3 (entradas 2 y 8) sin verse afectada la conversión.

Tabla 2.1Optimización de la reacción para la síntesis del derivado tricíclico **11a**.**10a:** Ar = Ph, X= TMS**10b:** Ar = 3,5-(CF₃)₂-C₆H₃, X= TMS**10c:** Ar = Ph, X= H**10d****10e**

Entrada ^a	Catalizador (mol%)	Disolvente	T (°C)	Conversión ^b	Tiempo (h)	Ee (%) ^c
1	(S)- 10a (20 mol%)	CH ₂ Cl ₂	t.a.	>99	1	90
2	(S)- 10b (20 mol%)	CH ₂ Cl ₂	t.a.	>99	5	94
3	(S)- 10c (20 mol%)	CH ₂ Cl ₂	t.a.	-	5	n.r. ^d
4	(S)- 10d (20 mol%)	CH ₂ Cl ₂	t.a.	>99	1.5	80
5	(S)- 10e (20 mol%)	CH ₂ Cl ₂	t.a.	-	-	n.r. ^d
6	(S)- 10b (20 mol%)	Tolueno	t.a.	80	21	91
7	(S)- 10b (20 mol%)	DCE	t.a.	60	21	91
8	(S)- 10a (20 mol%)	CHCl ₃	t.a.	>99	1	88
9	(S)- 10a (20 mol%)	CH ₂ Cl ₂	0	99	20	91
10	(S)- 10a (20 mol%)	CH ₂ Cl ₂	-10	99	20	96
11	(S)- 10a (20 mol%)	CHCl ₃	-10	99	20	95
12	(S)- 10b (20 mol%)	CH ₂ Cl ₂	-10	72	20	98
13	(S)- 10a (10 mol%)	CH ₂ Cl ₂	-10	85	20	84
14	(S)- 10a (5 mol%)	CH ₂ Cl ₂	-10	50	20	81

^a Todas las reacciones se llevaron a cabo a escala de 0.2 mmol en 1.0 mL del disolvente indicado. ^b Determinada mediante ¹H-RMN del crudo de reacción. ^c Determinada mediante SFC. ^d Nr: La reacción no tiene lugar.

La enantioselectividad fue aumentada al reducirse la temperatura a -10 °C, pero la conversión en estas condiciones fue menor en el caso del catalizador **10b** (compárense entradas 10 y 12) y, en el caso del catalizador **10a** la selectividad fue ligeramente mejor en CH₂Cl₂ que en CHCl₃ (compárense entradas 10 y 11). Puesto que el catalizador **10a** permitió obtener el producto con conversión total y excelente ee a -10 °C en CH₂Cl₂, se trató de reducir la carga catalítica en estas condiciones hasta 10 y 5 mol %, observándose una significativa reducción tanto en la conversión como en el exceso enantiomérico de la reacción (entradas 13 y 14, Tabla 2.1). Por lo tanto, las mejores condiciones para llevar a

cabo la desimetrización consistieron en el uso de un 20 mol% del catalizador **10a** en CH₂Cl₂, a -10 °C (entrada 10).

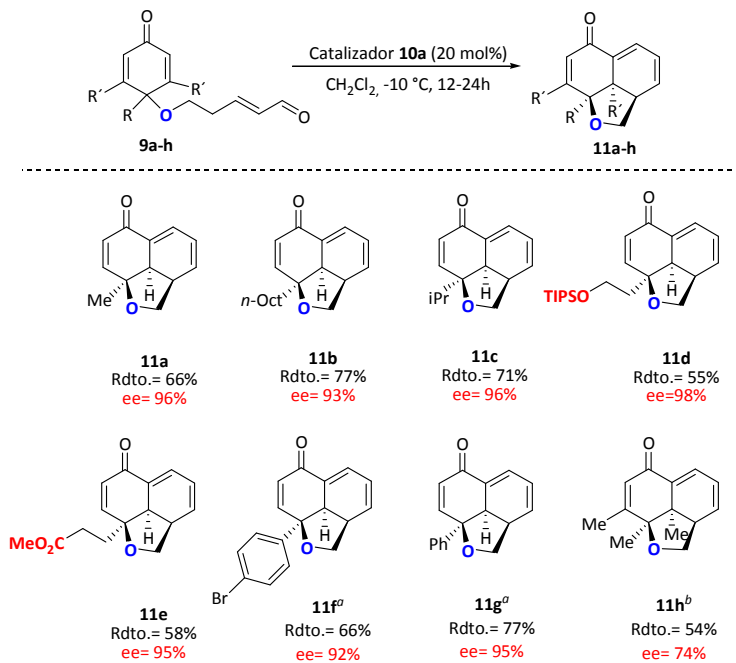
2.3.3 Alcance de la reacción

Una vez encontradas las condiciones óptimas se realizó el estudio del alcance de la reacción partiendo de ciclohexadienonas diferentemente sustituidas en las posiciones 3 y 4 (Tabla 2.2). Las ciclohexadienonas sustituidas en la posición 4, dieron lugar a la reacción con buenos rendimientos (54-71%) y excelentes enantioselectividades (74-96%) en el caso de diferentes sustituyentes alifáticos, tanto primarios como secundarios (**11a-c**).^a La incorporación en la posición terminal de la cadena alquílica, de un alcohol protegido o un éster permitió obtener derivados tricíclicos funcionalizados, conduciendo a los productos **11d** y **11e** incluso con mejor enantioselectividad, aunque con un ligero menor rendimiento. La reacción también se produjo con buenos resultados en el caso de sustituyentes aromáticos (**11f** y **11g**), aunque en estos casos, para obtener una buena enantioselectividad fue necesario aumentar el tiempo de reacción y disminuir la temperatura hasta -20 °C. La incorporación de sustituyentes en la posición 3 requirió mayores tiempos de reacción, dando lugar al producto **11h**, el cual presenta dos centros estereogénicos cuaternarios contiguos, con un rendimiento y enantioselectividad ligeramente menores.

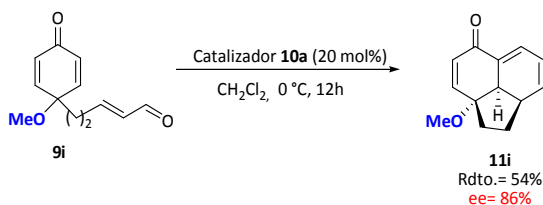
^a Desafortunadamente, no fue posible obtener el material de partida con un sustituyente *tert*butilo debido a que la oxidación del *p-tert*butilfenol no tuvo lugar, con lo cual no se pudo determinar si se producía la reacción [4+2].

Tabla 2.2

Alcance de la reacción.

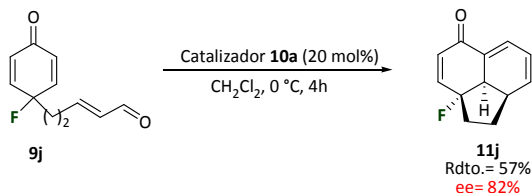

^a Reacción llevada a cabo a -20°C
^b Tiempo = 48 h

En todos los ejemplos anteriores el átomo de oxígeno ocupa una posición endocíclica en el anillo de cinco miembros formado, sin embargo, su incorporación exocíclica al producto final también fue posible. Así, se logró llevar a cabo la reacción a partir del producto **9i** obteniéndose el derivado tricíclico oxigenado **11i** con buen rendimiento, como un único diastereoisómero y con buen exceso enantiomérico (Esquema 2.12).


Esquema 2.12

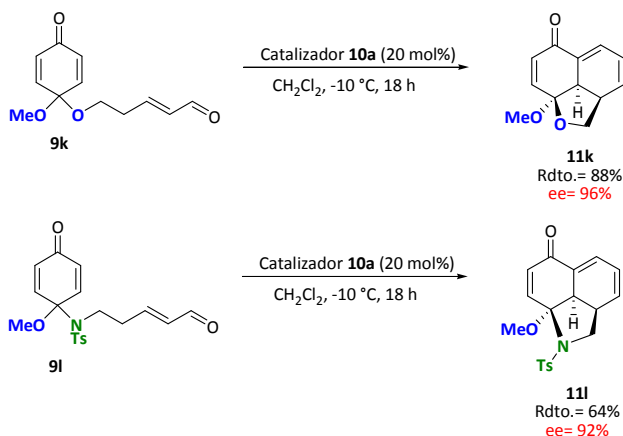
Incorporación de un átomo de oxígeno exocíclico.

La posibilidad de la introducción de otros heteroátomos resulta interesante en cuanto a la actividad biológica de estos derivados o de los productos naturales que pudieran ser sintetizados mediante esta metodología. En particular, la introducción de un átomo de flúor en el lugar de un hidrógeno, constituye una de las sustituciones bioisostéricas más utilizadas en química farmacéutica.⁶⁷ Por este motivo se llevó a cabo la reacción a partir del producto **9j**, obteniéndose el derivado fluorado **11j** en un menor tiempo de reacción y con un buen exceso enantiomérico (Esquema 2.13).

**Esquema 2.13**

Incorporación de un átomo de flúor en la estructura tricíclica.

Por otra parte, los acetales y hemiacetales se encuentran muy presentes en productos naturales y farmacéuticos, en distintas formas que incluyen desde simples carbohidratos hasta complejos espiroacetales.⁶⁸ Sin embargo los métodos para la síntesis de acetales quirales son escasos o difícilmente aplicables.^{69,70} En vista de la versatilidad del método para la introducción de un átomo de oxígeno en el producto final, tanto de forma *endo* como *exocíclica*, se decidió llevar a cabo la síntesis a partir del acetal **9k** y del hemiaminal-éter **9l** (Esquema 2.14). Satisfactoriamente, se pudieron obtener los derivados **11k** y **11l** con buen rendimiento y excelente enantioselectividad.

**Esquema 2.14**

Obtención de un acetal y un hemiaminal-éter.

Mediante esta metodología es posible obtener estructuras tricíclicas complejas formadas por dos anillos de seis miembros y un tercer anillo de cinco miembros, pudiendo ser este último un carbociclo o un heterociclo. Sin embargo en distintos productos policíclicos bioactivos se pueden encontrar heterociclos de mayor tamaño; así, por ejemplo, la arteanuina I y J o diversos cuasinoides con actividad antiparasitaria, presentan oxaciclos de seis miembros, pudiéndose encontrar también heptaciclos en el caso de algunos terpenoides (Figura 2.4).

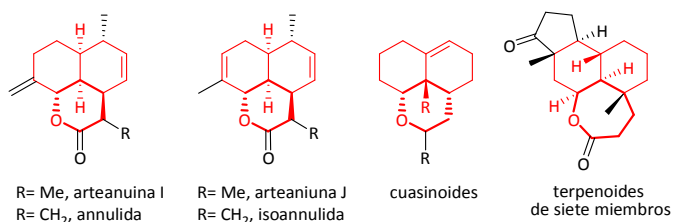
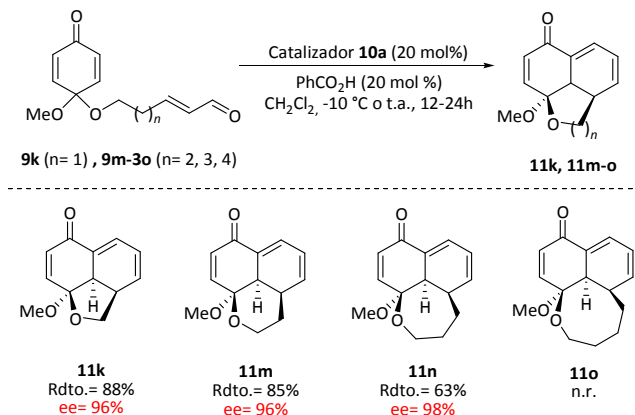


Figura 2.4

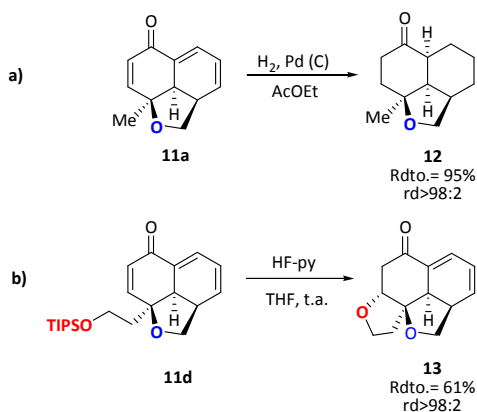
Productos bioactivos con oxaciclos de seis y siete miembros en su estructura.

Por lo tanto, con el objetivo de sintetizar los derivados tricíclicos que contuvieran un heterociclo de mayor tamaño, se llevó a cabo la reacción en las condiciones estándar utilizando como material de partida las ciclohexadienonas **9m-o** (Esquema 2.15), que presentan un resto alquílico con seis, siete u ocho átomos de carbono, en lugar de cinco. Desafortunadamente el primer intento partiendo de la ciclohexadienona **9m**, la cual presenta un resto alquílico con seis átomos de carbono, resultó infructuoso, observándose por RMN únicamente la polimerización del material de partida. Con el fin de evitar la formación del polímero se repitió la reacción en las mismas condiciones pero, en este caso, multiplicando por siete la dilución y empleando ácido benzoico como aditivo. De esta forma se obtuvo el producto **11m** con buen rendimiento y excelente enantioselectividad. La obtención del anillo de siete miembros **11n**, requirió temperatura ambiente, mientras que la síntesis del ciclo de ocho miembros **11o** no fue posible en estas condiciones de reacción.

**Esquema 2.15**

Incorporación de oxaciclos de diferentes tamaños en los derivados tricíclicos. (n.r. = no reacciona).

Finalmente, para demostrar la versatilidad del método se llevó a cabo la hidrogenación del derivado **11a**, lo que permitió obtener el derivado tricíclico saturado **12** como un único diastereoisómero, con excelente rendimiento (ecuación a, Esquema 2.16). Adicionalmente se desprotegió el derivado **11d**, lo que proporcionó el derivado tetracíclico **13** con un buen exceso diastereoisomérico, tras la adición oxa-Michael del alcohol a la enona del derivado tricíclico (ecuación b, Esquema 2.16).

**Esquema 2.16**

Transformaciones de los derivados tricíclicos.

La configuración absoluta de los derivados tricíclicos obtenidos se determinó mediante difracción de rayos X a partir de un monocristal del derivado **11f**, cuyo ORTEP se

ilustra en la Figura 2.5. Los datos cristalográficos, así como las longitudes y los ángulos de enlace se detallan en el apartado 2.5.5 de la Parte Experimental (Tablas 2.3 a 2.5).^b

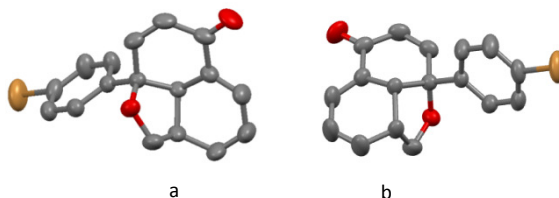


Figura 2.5

Vistas anterior (a) y posterior (b) del ORTEP del producto **11f**.

2.3.4 Propuesta mecanística y cálculos computacionales

Con el propósito de explicar la estereoquímica de los derivados tricíclicos obtenidos y establecer un posible mecanismo para la reacción desarrollada, se llevó a cabo un estudio computacional mediante cálculos DFT^c. Este estudio fue realizado por el Dr. R. Mas Ballesté y por el Dr. S. Díaz-Tendero, pertenecientes, respectivamente, a los departamentos de Química Inorgánica y Química, de la Universidad Autónoma de Madrid.

En primer lugar se evaluó la termodinámica de los cuatro posibles isómeros del material de partida que pueden dar lugar a los productos tricíclicos obtenidos (arriba, Figura 2.6), considerando como tal la dienamina del aldehído **9a**; dos para el isómero (*E,s-cis,E*) y otras dos para (*E,s-cis-Z*).^d Interessantemente, aunque todos están próximos en energía, existen diferencias energéticas entre ellos.^e Cada uno de los cuatro conformeros puede relacionarse con un enantiómero diferente del producto final, a través de sendos

^b Los datos cristalográficos correspondientes al compuesto **11f** han sido depositados en la base de datos CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre) con el número: 971440.

^c Las energías relativas libres de Gibbs fueron calculadas con DFT a nivel B3LYP/6-311+G(d,p)//B3LYP/6-31G(d) incluyendo el efecto disolvente (CH₂Cl₂) mediante la utilización del modelo SMD usando el programa Gaussian09 Revisión B.01 2010, M. J. Frisch *et al.*, Gaussian Inc. Wallingford CT 2009, tanto en la optimización como en los cálculos “single point”.

^d Los cuatro isómeros con geometría *s-trans* también fueron evaluados. Sin embargo, ese tipo de isómeros no son relevantes para la reactividad esperada tipo Diels-Alder, la cual normalmente procede a través de una conformación *s-cis*.

^e Bajo las condiciones experimentales todos los isómeros son accesibles cinéticamente a través de acid-assisted isomerization. Véase: S. Bertelsen, M. Marigo, S. Brandes, P. Dinér, K. A. Jørgensen, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 12973.

estados de transición (**TS-1** y **TS-2**). Sólo las aproximaciones *endo* de los dos isómeros con geometría *E* sobre el enlace 3,4 del dieno (izquierda, Figura 2.6), (*E,s-cis,E*)-**ent-11a** y (*E,s-cis,E*)-**11a**, y las aproximaciones *exo* de los isómeros con geometría *Z* sobre este enlace (izquierda, Figura 2.6), (*E,s-cis,Z*)-**ent-11a** y (*E,s-cis,Z*)-**11a**, pueden dar lugar al producto con la estereoquímica observada experimentalmente: el diastereoisómero con H^1 y H^2 en posición relativa *sin*. Sólo se aisló un estado de transición que relacionando cada isómero con el correspondiente producto, lo que sugiere un mecanismo concertado en lugar de por etapas.

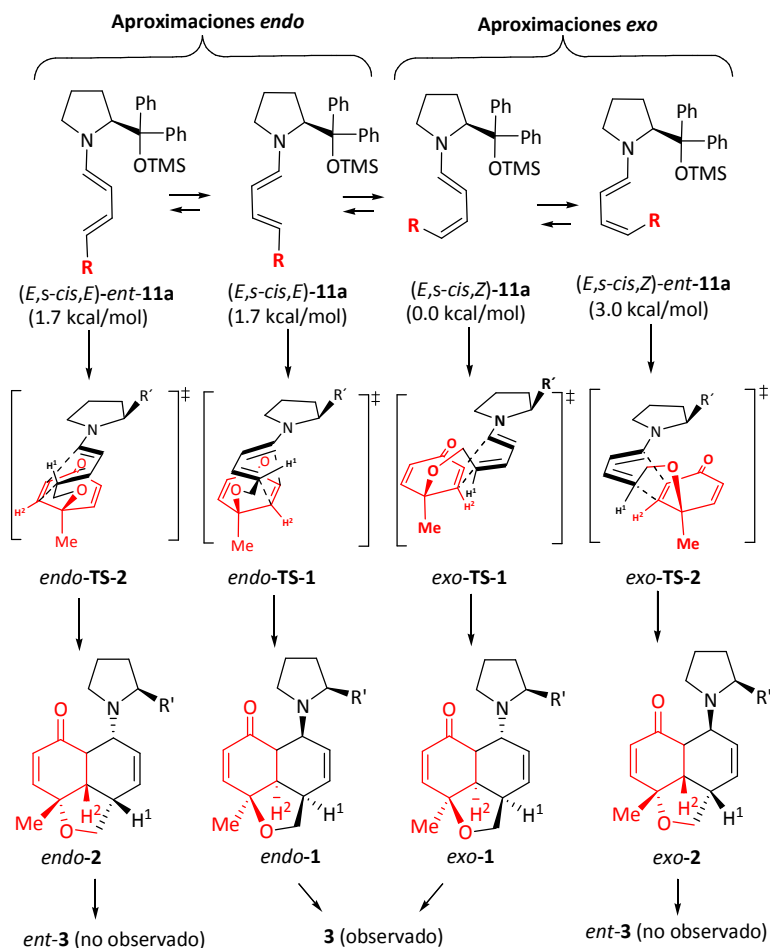


Figura 2.6

Explicación de la estereoquímica de los derivados tricíclicos basada en cálculos DFT.

A priori podría considerarse que la reacción transcurre mediante un mecanismo en etapas; en un primer momento se formaría un primer enlace C-C para dar lugar a un derivado bicíclico intermedio en forma de zwitterión, que más tarde evolucionaría para generar el triciclo final tras la formación de un segundo enlace C-C. Los estados de transición muestran la formación de un primer enlace C-C que daría lugar a una estructura bicíclica inicial. Sin embargo, la formación del segundo enlace C-C ocurre sin barrera energética, debido a que la formación de la estructura bicíclica inicial intermedia fija la geometría molecular para dar lugar al producto final, tal y como indican distintos estudios IRC (Intrinsic Reaction Coordinate) (Figura 2.7). Estos resultados indican que el mecanismo más probable de esta reacción transcurra a través de una cicloadición [4+2] concertada asíncrona, y no por etapas.

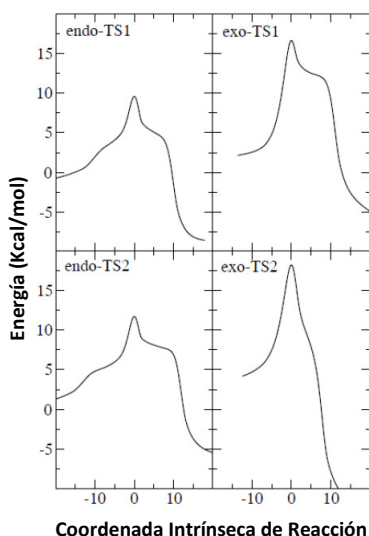


Figura 2.7

Coordenada intrínseca de reacción calculada para las aproximaciones endo (derecha) y exo (izquierda).

El origen de la enantioselectividad se ha considerado mediante la comparación de las barreras energéticas de los estados de transición que pueden dar lugar a **11a** (*exo-TS-1* y *endo-TS-1*) o a su enantiómero *ent-11a* (*exo-TS-2* and *endo-TS-2*) (Figura 2.8). Las dos aproximaciones tipo *exo* muestran una barrera energética mayor que las correspondientes aproximaciones *endo* (5.1 kcal·mol⁻¹ de diferencia para **TS-1** y 6.1 kcal·mol⁻¹ para **TS-2**). Estos datos están en concordancia con otros cálculos descritos en la bibliografía, donde se

observa una mayor estabilidad para los estados de transición tipo *endo*.⁷¹ Para las aproximaciones *endo*, más estables, la aproximación *endo-TS-1*, que da lugar al compuesto **11a** observado experimentalmente, procede con una barrera energética 2.5 kcal·mol⁻¹ más baja que la aproximación *endo-TS-2*. Por tanto estaríamos ante un caso de reacción de control cinético, donde la aproximación *endo-TS-2* es más inestable por las repulsiones estéricas entre el fragmento diénico y el grupo -OSi(CH₃)₃ del catalizador que no se presentan en la aproximación *endo-TS-1*.

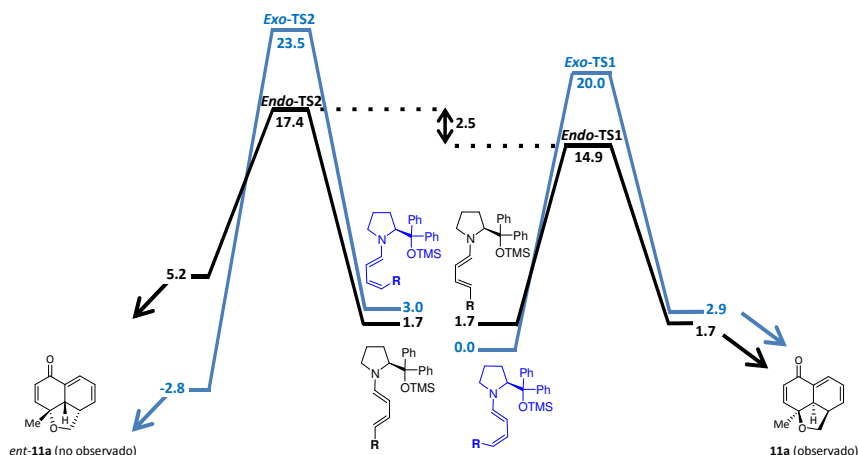
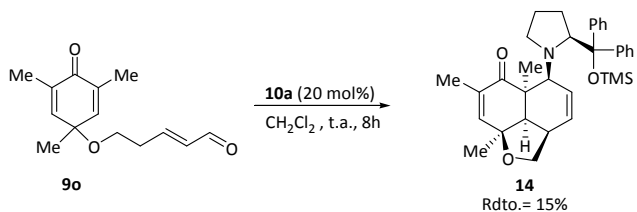


Figura 2.8

Perfil energético para el proceso de cicloadición donde se muestran las energías libres relativas de los intermedios y estados de transición y la geometría de los estados de transición.

Los cálculos se llevaron a cabo considerando como el producto un intermedio que contiene aún el catalizador **10a** unido a la estructura tricíclica. Por lo tanto como prueba de esta hipótesis, se llevó a cabo la reacción a partir del sustrato **9o** (Esquema 2.17), obteniéndose el producto **14** que presenta el catalizador en la estructura, puesto que la presencia de un grupo metilo en la posición dos de la quinona impide su liberación del aducto final. La estereoquímica relativa de los centros generados se resolvió mediante la técnica de RMN bidimensional, NOESY.



Esquema 2.17

Derivado tricíclico conteniendo el catalizador **10a**.

2.4 Conclusiones

Las conclusiones que pueden extraerse de este capítulo son las siguientes:

- 1) La estrategia desaromatización-desimetrización organocatalítica, ha sido aplicada a la síntesis de derivados tricíclicos enantioméricamente enriquecidos, permitiendo obtener los productos con excelente enantioselectividad, lo cual pone de manifiesto la potencial utilidad de dicha estrategia en la síntesis de productos naturales con mayor complejidad estructural.
- 2) La desimetrización se ha llevado a cabo mediante un procedimiento organocatalítico vía dienamina, utilizando para ello el catalizador de Jørgensen-Hayashi, posibilitando así la síntesis de los productos en condiciones suaves y con altas enantioselectividades.
- 3) El procedimiento tolera una amplia variedad de sustituyentes en las posiciones 3 y 4 del fenol de partida, permitiendo incluso la introducción de diferentes funciones, lo que posibilita la derivatización de los productos e incluso la obtención de tetraciclos. Por otra parte admite la introducción de anillos heteroaromáticos de diferentes tamaños así como la presencia de diferentes heteroátomos.
- 4) Los cálculos DFT realizados indican que la reacción transcurre a través de un mecanismo de cicloadición [4+2] asíncrono y no en dos etapas de reacción (adición de Michael-condensación aldólica).

2.5 Parte Experimental

2.5.1 Materiales

Los reactivos comerciales fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. Los reactivos de partida y los disolventes disponibles comercialmente se utilizaron sin purificación previa.

2.5.2 Técnicas

Todas las técnicas utilizadas en la presente parte experimental han sido descritas anteriormente en el capítulo 1 (apartado 1.5.2). Las proporciones diastereoisoméricas se establecieron por integración de señales bien separadas en los espectros de ^1H -RMN de las mezclas correspondientes. En este caso, los excesos enantioméricos se determinaron por Cromatografía de Fluido Supercrítico (SFC) mediante la integración de señales a partir de los cromatogramas registrados en un cromatógrafo *Agilent 1100 series*, empleando columnas quirales Chiralpak IA o IB (indicado en cada caso) y, como fase móvil, una mezcla CO_2/MeOH (cuya proporción se indica en cada caso). Para la introducción de las muestras en el equipo éstas fueron previamente disueltas en MeOH ($C = 10 \text{ mg/mL}$).

2.5.3 Métodos generales

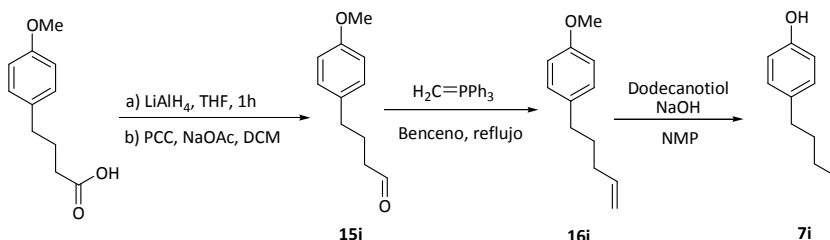
Los métodos empleados han sido descritos previamente en el apartado 1.5.3.

2.5.4 Procedimientos experimentales y caracterización

2.5.4.1 Síntesis y caracterización de los materiales de partida

Procedimiento Experimental 2A: Síntesis del fenol **7i**

El fenol **7i** fue sintetizado mediante una secuencia en tres etapas, según se indica en el Esquema 2.18.

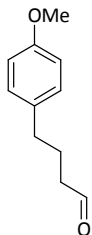


Esquema 2.18

Procedimiento experimental 1A.

1-Metoxi-4-(pent-4-en-1-il)benceno

15i

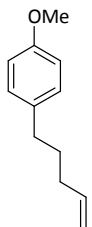


El producto se obtuvo a partir del ácido 4-(4-metoxifenil)butírico, siguiendo un procedimiento publicado,^{72a,b} como un aceite incoloro con las mismas propiedades espectroscópicas. **Rdto.** = 78%.

¹H-RMN (CDCl₃) δ: 9.75 (s, 1H), 7.11 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.85 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 2.60 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.47 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.93 (m, 2H).

1-Metoxi-4-(pent-4-en-1-il)benceno

16i



En un matraz de fondo redondo de dos bocas seco, se añade bromuro de (metil)trifenilfosfonio (12.27 mmol) y THF anhidro (70 mL) bajo atmósfera de Ar. La mezcla se enfría en baño de hielo y se añade *tert*-butóxido potásico (27.81 mmol), rápidamente. Se deja que la reacción alcance t.a. y después se calienta a reflujo. Durante el reflujo puede observarse la formación del iluro debido al color amarillo persistente. Tras una hora se detiene el reflujo, se deja que la reacción alcance t.a. y se introduce en un baño de hielo. En este momento se añade gota a gota el compuesto **15i** (8.20 mmol) disuelto en el mínimo volumen de THF anhidro necesario para disolverlo. Tras la adición la reacción se agita durante 4-6 h. a t.a. y se monitoriza mediante TLC y ¹H-RMN. Una vez completada, la reacción se trata con disolución saturada de NH₄Cl. La fase acuosa se extrae 3 veces con AcOEt y las fases orgánicas se mezclan y se secan con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evapora a presión reducida y el crudo se purifica mediante columna cromatográfica (hexano), obteniéndose el producto puro como un aceite incoloro. **Rdto.** = 76%.

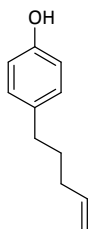
¹H-RMN (CDCl₃) δ: 7.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.83 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 5.82 (m, 1H), 4.99 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 2.58 (m, 2H), 2.08 (m, 2H), 1.69 (m, 2H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 157.7, 138.6, 134.5, 129.3, 114.6, 113.7, 55.2, 34.4, 33.2, 30.8.

EMAR (EI+): [M]⁺ calculado para C₁₂H₁₆O: 176.1201; encontrado: 176.1209.

4-(Pent-4-en-1-il)fenol

7i



En un matraz de fondo redondo de dos bocas seco, se añade **16i** (6.0 mmol) y NaOH (17.9 mmol). Bajo atmósfera de Ar se añade NMP anhidro (6 mL) y después 1-dodecanotiol (9.0 mmol). La mezcla resultante se agita a 130 °C y se monitoriza mediante TLC. Tras el consumo de **16i**, se deja que la reacción alcance t.a., se acidifica con HCl (aprox. 10 mL) y se diluye con AcOEt. La fase acuosa se extrae con AcOEt (2x15 mL) y las fases orgánicas se mezclan, se lavan

con agua y salmuera y se secan sobre Na_2SO_4 . El disolvente se evapora a presión reducida y el producto es purificado mediante CF (14/1 hexano:AcOEt), obteniéndose un aceite incoloro. **Rdto.**= 90%.

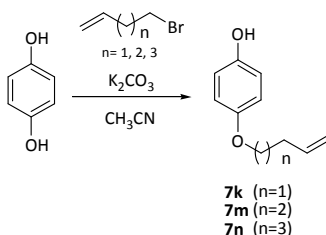
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ : 7.04 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 6.76 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.81 (m, 1H), 4.99 (m, 2H), 2.55 (m, 2H), 1.67 (m, 2H), 1.27 (m, 2H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) δ : 153.5, 138.6, 134.6, 129.5, 115.1, 114.6, 34.3, 33.2, 30.8.

EMAR (EI+): $[\text{M}^+]$ calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}$: 162.1045; encontrado: 162.1052.

Procedimiento Experimental 2B: Síntesis de los fenoles 7k, 7m y 7n

Los fenoles **7k** y **7m**, **n** fueron sintetizados mediante la monoalquilación de hidroquinona, tal y como se indica en el Esquema 2.19.



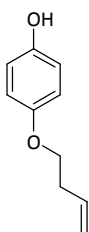
Esquema 2.19

Procedimiento experimental **2B**.

Sobre una disolución de hidroquinona (13 mmol) y K_2CO_3 (13.5 mmol) en CH_3CN (0.5M) se añade el correspondiente bromoalqueno (6.8 mmol) y la mezcla se calienta a reflujo durante 12 h. Entónces se deja que la reacción alcance t.a., se acidifica con HCl 10% (v/v) y se extrae con CH_2Cl_2 . Las fases orgánicas se combinan, se lavan con agua hasta pH neutro, se secan sobre MgSO_4 anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo resultante se purifica mediante cromatografía flash (eluyente indicado en cada caso).

4-(But-3-en-1-iloxi)fenol

7k



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **2B**, a partir de 4-bromo-1-buteno. El crudo se purificó mediante CF (6/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite amarillo. **Rdto.**= 64%.

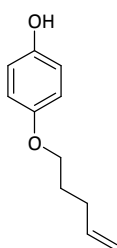
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ : 6.80 (m, 4H), 5.94 (m, 1H), 5.21-5.00 (m, 2H), 4.00 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.55 (c, J = 6.5 Hz, 2H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) δ : 152.8, 149.8, 134.5, 117.1, 116.3, 116.1, 68.3, 33.7.

EMAR (EI+): $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$: 164.0837; encontrado: 164.0835.

4-(Pent-4-en-1-iloxi)fenol

7m



El producto se obtuvo a partir de 5-bromo-1-penteno, siguiendo el procedimiento experimental **2B**, como un sólido amarillo. El crudo se purificó mediante CF (7/1 hexano:AcOEt). **Rdto.** = 55%, **P.f.** ($^{\circ}\text{C}$) = 35.0-35.5.

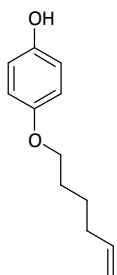
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ : 6.89–6.69 (m, 4H), 5.90-5.80 (m, 1H), 5.35 (s, 1H), 5.11-4.97 (m, 2H), 3.99–3.86 (m, 2H), 2.35–2.15 (m, 2H), 1.98–1.80 (m, 2H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) δ : 153.4, 149.8, 138.2, 116.4, 116.1, 115.4, 68.4, 30.4, 28.8.

EMAR (EI+): $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_2$: 178.0994; encontrado: 178.0993.

4-(Hex-5-en-1-iloxi)fenol

7n



El producto se obtuvo a partir de 6-bromo-1-hexeno, siguiendo el procedimiento experimental **2B**. El crudo se purificó mediante CF (20/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un sólido marrón. **Rdto.** = 42%, **P.f.** ($^{\circ}\text{C}$): 37.1-37.3.

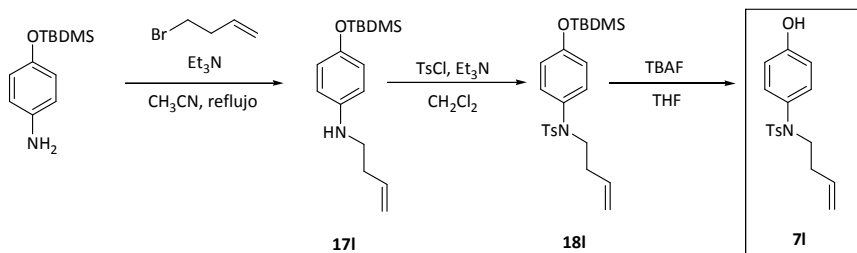
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ : 6.82-6.71 (m, 4H), 6.61 (sa, 1H), 5.98-5.78 (m, 1H), 5.10–4.92 (m, 2H), 3.89 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.18-2.05 (m, 2H), 1.84–1.69 (m, 2H), 1.66-1.47 (m, 2H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) δ : 153.2, 150.3, 138.9, 116.3, 116.0, 115.0, 68.9, 33.7, 29.1, 25.6.

EMAR (EI+): $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_2$: 192.1150; encontrado: 192.1141.

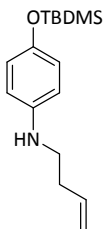
Procedimiento Experimental 2C: Síntesis del fenol 7I

El fenol **7I** se sintetizó a través de la secuencia en tres etapas mostrada en el Esquema 2.20.



Esquema 2.20

Procedimiento experimental **2C**.

N*-(But-3-en-1-il)-4-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)anilina*17I**

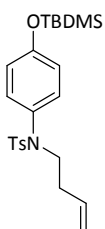
Sobre una disolución de 4-((*tert*-butildimetil silil)oxi)anilina (4.48 mmol) en CH_3CN (10 mL) se añade 4-bromo-1-buteno (4.92 mmol) y Et_3N (4.92 mmol). La mezcla se calienta a reflujo hasta consumo del material de partida (monitorizado mediante TLC). Posteriormente el crudo se enfría, se diluye con agua (10 mL) y se extrae con CH_2Cl_2 (3x20 mL). Las fases orgánicas se mezclan y se secan sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se evapora a presión reducida.

El producto se purifica mediante CF (50/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto puro como un aceite amarillo. **Rdto.** = 32%.

^1H -RMN (CDCl_3) δ : 6.70 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.52 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 5.92-5.74 (m, 1H), 5.22-5.05 (m, 2H), 3.14 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.34 (c, J = 6.7 Hz, 2H), 0.98 (s, 9H), 0.16 (s, 6H).

^{13}C -RMN (CDCl_3) δ : 147.4, 142.8, 135.9, 120.6, 117.0, 114.0, 43.7, 33.8, 25.8, 18.2, 4.5.

EMAR (EI+): $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NOSi}$: 277.1862; encontrado: 277.1874.

N*-(But-3-en-1-il)-*N*-(4-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)fenil)-4-metilbenceno sulfonamida*18I**

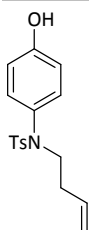
Sobre una disolución de **17I** (1.33 mmol) y TsCl (1.46 mmol) en CH_2Cl_2 (5 mL), se añade Et_3N (1.46 mmol). La mezcla se agita a t.a. hasta el consumo del material de partida (monitorizado mediante TLC) y después, el crudo se lava con agua (3x5 mL). La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se evapora a presión reducida. El producto se purifica mediante CF (30/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto puro como un sólido blanco.

Rdto. = 91%, **P.f.** ($^\circ\text{C}$): 134.9-135.5.

^1H -RMN (CDCl_3) δ : 7.49 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.87 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.74 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 5.81-5.65 (m, 1H), 5.06-4.96 (m, 2H), 3.55 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.42 (s, 3H), 2.23-2.11 (m, 2H), 0.98 (s, 9H), 0.20 (s, 6H).

^{13}C -RMN (CDCl_3) δ : 155.3, 143.2, 135.4, 134.6, 132.1, 130.1, 129.3, 127.7, 120.3, 116.9, 50.1, 32.8, 25.6, 21.5, 18.2, 4.4.

EMAR (ESI+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{NO}_3\text{SSi}$: 432.1950; encontrado: 432.2036.

N*-(But-3-en-1-il)-*N*-(4-hidroxifenil)-4-metilbencenosulfonamida*7I**

Sobre una disolución de TBAF 1M en THF (1.26 mmol) bajo atmósfera de Ar, se añade una disolución de **18I** (1.16 mmol) en THF anhidro. La mezcla se agita a t.a. hasta el consumo del material de partida (monitorizado mediante TLC). La reacción se trata entonces con disolución saturada de NH_4Cl (10 mL) y se extrae

con Et₂O. Las fases orgánicas se mezclan, se secan sobre MgSO₄ anhidro y el disolvente se evapora a presión reducida. El producto se purifica mediante CF (2/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto puro como un sólido blanco. **Rdto.** = 90%, **P.f.** (°C): 166.3-166.9.

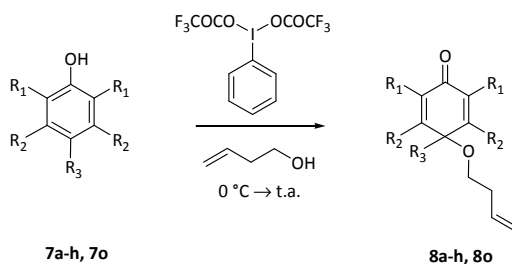
¹H-RMN (CDCl₃) δ: 7.49 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.25 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 6.91–6.72 (m, 2H), 6.75–6.51 (m, 2H), 5.81–5.65 (m, 2H), 5.18–4.95 (m, 2H), 3.54 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.42 (s, 3H), 2.10 (c, *J* = 6.5 Hz, 2H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 155.6, 143.4, 135.3, 134.5, 131.2, 130.3, 129.4, 127.7, 117.0, 115.8, 50.2, 32.7, 21.5.

EMAR (ESI⁺): [M+Na]⁺ calculado para C₁₇H₁₉NO₃Na: 340.1086; encontrado: 340.0976.

Procedimiento Experimental 2D: Síntesis de los alquenos intermedios 8a-h, 8o^f

Los fenoles comerciales fueron transformados en las ciclohexadienonas intermedias **8a-h** y **8o** mediante una desaromatización oxidativa empleando PIFA y 3-buten-1-ol, según se indica en el Esquema 2.21.

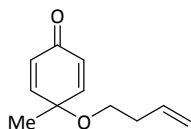


Esquema 2.21

Procedimiento experimental 2D.

En un matraz de fondo redondo se disuelve el correspondiente fenol comercial **7a-h**, **7o** (5.0 mmol) en 7.5 mL de 3-buten-1-ol. Sobre la disolución resultante se añade, a 0 °C, bis(trifluoroacetato)iodobenceno (5 mmol). La mezcla es agitada a 0 °C durante 5 minutos y después se deja alcanzar t.a. hasta determinar conversión completa por TLC. Se evapora aprox. 2/3 del disolvente a presión reducida y el crudo resultante se purifica mediante CF (la composición de la fase móvil se indica en cada caso).

^f En el caso de los alquenos intermedios **8m** y **8n** no fue necesario su aislamiento, llevándose a cabo la síntesis de las ciclohexadienonas **9m** y **9n**, en “one-pot”, según se indica en el procedimiento experimental **2G**.

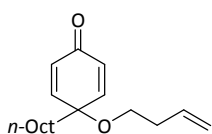
4-(But-3-en-1-iloxi)-4-metilciclohexa-2,5-dienona**8a**

El producto fue obtenido a partir de *p*-cresol, siguiendo el procedimiento experimental **2D**. El crudo se purificó mediante CF (20/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite rojo. **Rdto.**= 40%.

¹H-RMN (CDCl₃): δ 6.77 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H), 6.26 (d, *J* = 10.1 Hz, 2H), 5.82-5.69 (m, 1H), 5.08-5.00 (m, 2H), 3.33 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.32-2.17 (m, 2H), 1.41 (s, 3H).

¹³C-RMN (CDCl₃): δ 185.1, 152.1, 134.6, 129.9, 116.6, 72.2, 65.0, 34.6, 26.3.

EMAR (EI⁺): [M]⁺ calculado para C₁₁H₁₄O₂: 178.0994; encontrado: 178.1007.

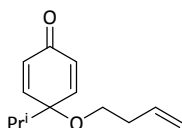
4-(But-3-en-1-iloxi)-4-octilciclohexa-2,5-dienona**8b**

El producto se obtuvo a partir de 4-octilfenol, siguiendo el procedimiento experimental **2D**. El crudo se purificó mediante CF (20/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite naranja. **Rdto.**= 33%.

¹H-RMN (CDCl₃): δ: 6.74 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H), 6.31 (d, *J* = 10.1 Hz, 2H), 5.83-5.69 (m, 1H), 5.07-5.00 (m, 2H), 3.34 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.32-2.17 (m, 2H), 1.72-1.70 (m, 2H), 1.25-1.18 (m, 12H), 0.85 (t, *J* = 6.3 Hz, 3H).

¹³C-RMN (CDCl₃): δ: 185.6, 151.7, 134.8, 130.9, 116.6, 75.5, 64.7, 39.5, 34.7, 31.8, 29.7, 29.3, 29.1, 23.3, 22.6, 14.0.

EMAR (ESI⁺): [M+H]⁺ calculado para C₁₈H₂₉O₂: 277.2089; encontrado: 277.2160.

4-(But-3-en-1-iloxi)-4-isopropilciclohexa-2,5-dienona**8c**

El producto se obtuvo a partir de 4-isopropilfenol, siguiendo el procedimiento experimental **2D**. El crudo se purificó mediante CF (30/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite rojo. **Rdto.**= 19%.

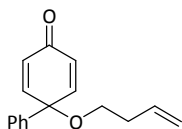
¹H-RMN (CDCl₃): δ: 6.71 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H), 6.34 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H), 5.83-5.69 (m, 1H), 5.07-4.98 (m, 2H), 3.32 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.25 (c, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.96 (sp, *J* = 6.9 Hz, 1H), 0.90 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H).

¹³C-RMN (CDCl₃): δ: 185.7, 150.5, 135.0, 131.8, 116.5, 77.9, 64.6, 36.6, 34.8, 17.0.

EMAR (ESI⁺): [M+H]⁺ calculado para C₁₃H₁₉O₂: 207.1307; encontrado: 207.1384.

4-(But-3-en-1-iloxi)-4-fenilciclohexa-2,5-dienona

8d



El producto se obtuvo a partir de 4-fenilfenol, siguiendo el procedimiento experimental **2D**. El crudo fue purificado mediante CF (10/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un sólido amarillo. **Rdto.** = 19%, **P.f.** (°C): 94.2-95.4.

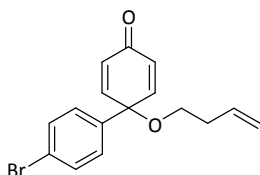
¹H-RMN (CDCl₃) δ: 7.46 (dt, *J* = 3.7, 2.2 Hz, 2H), 7.38–7.28 (m, 3H), 6.81 (d, *J* = 10.1 Hz, 2H), 6.37 (d, *J* = 10.1 Hz, 2H), 5.96-5.80 (m, 1H), 5.20-5.05 (m, 2H), 3.60 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.43 (c, *J* = 6.6 Hz, 2H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 185.7, 150.9, 138.4, 134.9, 129.6, 128.8, 128.3, 125.7, 116.8, 76.2, 64.5, 34.7.

EMAR (ESI+): [M+H]⁺ calculado para C₁₆H₁₇O₂: 241.115; encontrado: 241.1214.

4-(But-3-en-1-iloxi)-4-(*p*-bromofenil)ciclohexa-2,5-dienona

8e



El producto se obtuvo, a partir de 4'-bromo-(1,1'-bifenil)-4-ol, siguiendo el procedimiento experimental **2D**. El crudo se purificó mediante CF (10/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite naranja. **Rdto.** = 18%.

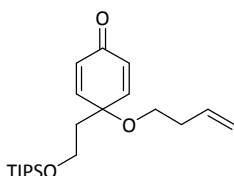
¹H-RMN (CDCl₃) δ: 7.41 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.70 (d, *J* = 10.1 Hz, 2H), 6.32 (d, *J* = 10.1 Hz, 2H), 5.86-5.73 (m, 1H), 5.20-4.95 (m, 2H), 3.52 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.36 (c, *J* = 6.6 Hz, 2H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 185.3, 150.2, 137.5, 134.7, 131.8, 129.9, 127.5, 122.4, 116.9, 75.7, 64.5, 34.6.

EMAR (ESI+): [M+H]⁺ calculado para C₁₆H₁₆BrO₂: 319.0255; encontrado: 319.0315.

4-(But-3-en-1-iloxi)-4-(2-((*triisopropilsilil*)oxi)etil)ciclohexa-2,5-dienona

8f

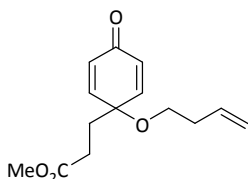


El producto se obtuvo de 4-(2-(tris(isopropilsilileter)etil)fenol, siguiendo el procedimiento experimental **2D**. El crudo se purificó mediante **CF** (20/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite rojo. **Rdto.** = 14%.

¹H-RMN (CDCl₃) δ: 6.85 (d, *J* = 10.1 Hz, 2H), 6.28 (d, *J* = 10.1 Hz, 2H), 5.83-5.69 (m, 1H), 5.08-5.00 (m, 2H), 3.79 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.34 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.26 (c, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.94 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 1.10-0.95 (m, 21H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 185.6, 151.7, 134.8, 130.2, 116.5, 74.0, 64.5, 58.2, 43.3, 34.7, 17.9, 12.2.

EMAR (ESI+): [M+H]⁺ calculado para C₂₁H₃₇O₃Si: 365.5942; encontrado: 365.2516.

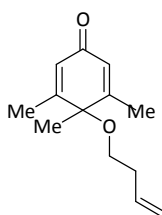
Propanoato de metil-3-(1-(but-3-en-1-iloxi)-4-oxaciclohexa-2,5-dien-1-ilo)**8g**

El producto fue obtenido a partir de propanoato de et-3-(4-hidroxifenil)-1-ilo, siguiendo el procedimiento experimental **2D**. El crudo se purificó mediante CF (3/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite rojo. **Rdto.**= 11%.

¹H-RMN (CDCl₃) δ: 7.01 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.73 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 5.84-5.67 (m, 1H), 5.14-4.97 (m, 2H), 3.74-3.61 (m, 5H), 2.84 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.57 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.29 (c, *J* = 7.5 Hz, 2H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 173.6, 154.2, 132.4, 129.3, 117.7, 115.3, 61.6, 51.6, 36.0, 30.9, 30.1.

EMAR (ESI+): [M+Na]⁺ calculado para C₁₁H₁₈O₄Na: 273.1103; encontrado: 273.1104.

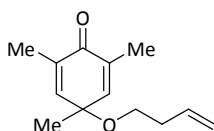
4-(But-3-en-1-iloxi)-3,4,5-trimetilciclohexa-2,5-dienona**8h**

El producto se obtuvo a partir de 3,4,5-trimetilfenol, siguiendo el procedimiento experimental **2D**. El crudo se purificó mediante CF (20/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite amarillo. **Rdto.**= 30%.

¹H-RMN (CDCl₃) δ: 6.12 (s, 2H), 5.69-5.54 (m, 1H), 5.01-4.99 (m, 2H), 3.00 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.26 (c, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.97 (s, 6H), 1.37 (s, 3H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 185.5, 161.3, 135.1, 129.2, 117.0, 76.5, 64.5, 34.6, 25.3, 18.1.

EMAR (ESI+): [M+H]⁺ calculado para C₁₃H₁₉O₂: 207.1379; encontrado: 207.1374.

4-(But-3-en-1-iloxi)-2,4,6-trimetilciclohexa-2,5-dienona**8o**

El producto se obtuvo a partir de 2,4,6-trimetilfenol, siguiendo el procedimiento experimental **2D**. El crudo se purificó mediante CF (20/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite incoloro. **Rdto.**= 41%.

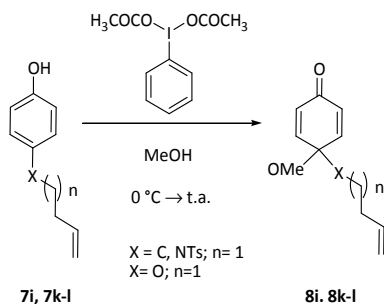
¹H-RMN (CDCl₃) δ: 6.44 (s, 2H), 5.82-5.58 (m, 1H), 5.01-4.92 (m, 2H), 3.20 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.19 (c, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.82 (s, 6H), 1.29 (s, 3H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 184.9, 147.2, 137.4, 136.1, 116.4, 72.1, 64.4, 34.8, 26.7, 15.9.

EMAR (EI+): [M]⁺ calculado para C₁₃H₁₈O₂: 206.1307; encontrado: 206.1299.

Procedimiento Experimental 2E: Síntesis de los alquenos intermedios 8i, 8k-l

Los fenoles no comerciales fueron transformados en las ciclohexadienonas intermedias **8i-n** mediante una desaromatización oxidativa empleando PIDA y MeOH, según se indica en el Esquema 2.22.



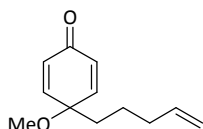
Esquema 2.22

Procedimiento experimental 2E.

En un matraz de fondo redondo se disuelve el correspondiente fenol **7i, 7k-l** (2.6 mmol) en MeOH (0.23 M). Sobre la disolución resultante se añade, a 0 °C, diacetato iodosobenceno (2.6 mmol). La mezcla es agitada a 0 °C durante 5 minutos y después se deja reaccionar a t.a. hasta conversión completa (determinado por TLC). Se evapora aprox. 2/3 del disolvente a presión reducida y el crudo resultante se purifica mediante CF (la composición de la fase móvil se indica en cada caso).

4-Metoxi-4-(pent-4-en-1-il)ciclohexa-2,5-dienona

8i

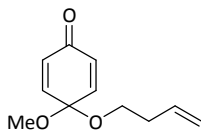


El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental 2E, a partir de **7i**. El crudo se purificó mediante CF (10/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite amarillo. **Rdto.** = 46%.

¹H-RMN (CDCl₃) δ : 6.72 (d, J = 10.3 Hz, 2H), 6.35 (d, J = 10.3 Hz, 2H), 5.80-5.63 (m, 1H), 5.01-4.87 (m, 2H), 3.20 (s, 3H), 2.02 (dd, J = 14.0, 7.1 Hz, 2H), 1.77-1.61 (m, 2H), 1.43-1.17 (m, 2H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ : 185.8, 151.4, 138.1, 131.8, 115.5, 76.1, 53.4, 39.2, 34.0, 23.1.

EMAR (EI+): $[M]^+$ calculado para C₁₂H₁₆O₂: 192.1150, encontrado: 192.1149.

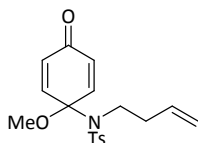
4-(But-3-eniloxi)-4-metoxiciclohexa-2,5-dienona
8k


El producto se obtuvo a partir de **7k**, siguiendo el procedimiento experimental **2E**. El crudo se purificó mediante CF (3/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite amarillo.

Rdto.= 62%. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ : 6.78 (d, J = 10.5 Hz, 2H), 6.24 (d, J = 10.2 Hz, 2H), 5.77 (m, 1H), 5.10-5.01 (m, 2H), 3.58 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 3.34 (s, 3H), 2.33 (c, J = 6.6 Hz, 2H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) δ : 185.1, 143.6, 134.4, 130.0, 116.9, 62.3, 50.4, 50.3, 34.4.

EMAR (EI $^+$): $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$: 194.0943; encontrado: 194.0941

***N*-(But-3-en-1-il)-*N*-(1-metoxi-4-oxaciclohexa-2,5-dien-1-il)-4-metilbencenosulfonamida**
8l


El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **2E**, a partir de **7l**. El crudo se purificó mediante CF (4/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un sólido naranja. **Rdto.**= 97%, **P.f.** ($^{\circ}\text{C}$)= 114.9-115.4.

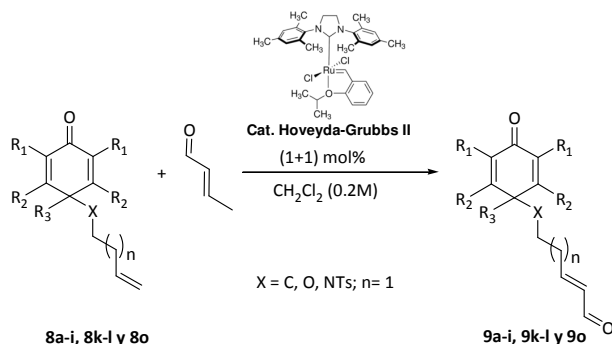
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ : 7.63 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.21 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 6.81 (d, J = 10.3 Hz, 2H), 6.19 (d, J = 10.3 Hz, 2H), 5.81-5.63 (m, 1H), 5.13-4.95 (m, 2H), 3.45-3.32 (m, 2H), 3.14 (s, 3H), 2.47 (c, J = 7.5 Hz, 2H), 2.38 (s, 3H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) δ : 184.2, 144.3, 143.4, 139.2, 134.6, 130.2, 129.2, 127.3, 117.1, 84.8, 51.4, 45.7, 36.2, 21.5.

EMAR (ESI $^+$): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_4\text{SNa}$: 370.1191; encontrado: 370.1102.

Procedimiento Experimental 2F: Síntesis de las ciclohexadienonas 9a-i, 9k-l, 9o

Las ciclohexadienonas de partida **9a-i**, **9k-l** y **9o** fueron sintetizadas a partir de las correspondientes ciclohexadienonas intermedias **8a-i**, **8a-l** y **8o**, mediante una reacción de metátesis, empleando el catalizador de Grubbs de segunda generación, según se indica en el Esquema 2.23.



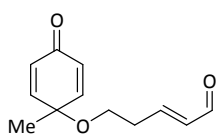
Esquema 2.23

Procedimiento experimental **2F**.

En un tubo sellado bajo atmósfera de Ar, se disuelve crotonaldehído (1.78 mmol) y el alqueno **8a-i**, **8k-l**, **8o**, correspondiente (0.59 mmol) en diclorometano anhidro (3.11 mL). La disolución resultante es desgasificada mediante burbujeo de Ar y, a continuación se añade el catalizador de Hoveyda-Grubbs (1 mol%) y se calienta a reflujo (40 °C) con agitación. La reacción es monitorizada mediante ¹H-RMN tras 5 h y, en caso de que el alqueno no se hubiera consumido en este tiempo, se añade una segunda carga adicional de catalizador (1 mol%). Una vez consumido completamente el material de partida, se reduce el volumen de disolvente a presión reducida y el crudo se purifica mediante CF (el eluyente utilizado se indica en cada caso) obteniéndose los aldehídos α,β-insaturados **9a-i**, **9k-l** y **9o**.

(E)-5-((1-Metil-4-oxociclohexa-2,5-dien-1-il)oxi)pent-2-enal

9a

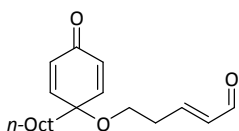


El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **2F**, a partir de **8a**. El crudo se purificó mediante CF (3/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite amarillo. **Rdto.**= 68%.

¹H-RMN (CDCl₃) δ: 9.50 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.85-6.73 (m, 3H), 6.27 (d, *J* = 9.9 Hz, 2H), 6.15 (dd, *J* = 15.7, 7.8 Hz, 1H), 3.45 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.54 (c, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.42 (s, 3H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 193.6, 184.9, 154.2, 151.3, 134.4, 130.3, 72.5, 63.3, 33.4, 26.3.

EMAR (EI+): [M+Na]⁺ calculado para C₁₂H₁₄O₃Na: 229.0843; encontrado: 229.0829.

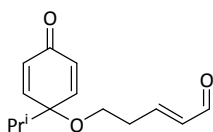
(E)-5-((1-Octil-4-oxociclohexa-2,5-dien-1-il)oxi)pent-2-enal**9b**

El producto fue obtenido siguiendo el procedimiento experimental **2F**, a partir de **8b**. El crudo se purificó mediante CF (4/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite rojo. **Rdto.**= 49%.

¹H-RMN (CDCl₃) δ: 9.52 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.81 (dt, *J* = 15.7, 6.7 Hz, 1H), 6.70 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H), 6.33 (d, *J* = 10.1 Hz, 2H), 6.15 (dd, *J* = 15.7, 7.7 Hz, 1H), 3.47 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.55 (c, *J* = 6.1 Hz, 2H), 1.72 (bs, 2H), 1.30-1.15 (m, 12H), 0.86 (t, *J* = 6.2 Hz, 3H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 193.6, 185.3, 154.4, 150.8, 134.4, 131.2, 75.7, 63.0, 39.4, 33.4, 31.7, 29.7, 29.2, 29.1, 23.3, 22.6, 14.0.

EMAR (ESI+): [M+Na]⁺ calculado para C₁₉H₂₈O₃Na: 327.1938; encontrado: 327.1938.

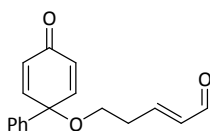
(E)-5-((1-Isopropil-4-oxociclohexa-2,5-dien-1-il)oxi)pent-2-enal**9c**

El producto se obtuvo a partir de **8c**, siguiendo el procedimiento experimental **2F**. El crudo se purificó mediante CF (5/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite rojo. **Rdto.**= 54%.

¹H-RMN (CDCl₃) δ: 9.49 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.80 (dt, *J* = 15.7, 6.7 Hz, 1H), 6.69 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H), 6.36 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H), 6.15 (dd, *J* = 15.7, 7.8 Hz, 1H), 3.45 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.54 (c, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.96 (sp, *J* = 6.9 Hz, 1H), 0.90 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 193.7, 185.4, 154.6, 149.7, 134.4, 132.1, 78.0, 63.0, 36.6, 33.5, 16.9.

EMAR (ESI+): [M+Na]⁺ calculado para C₁₄H₁₈O₃Na: 257.1156; encontrado: 257.1145.

(E)-5-((4-Oxo-1,4-dihidro-[1,1'-bifenil]-1-il)oxi)pent-2-enal**9d**

El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **2F**, a partir de **8d**. El crudo se purificó mediante CF (3/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un sólido blanco. **Rdto.**= 70%, **P.f. (°C)**= 123.3-124.1.

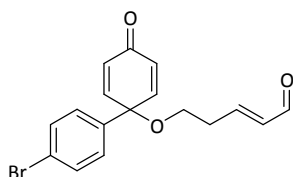
¹H-RMN (CDCl₃) δ: 9.54 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.44-7.27 (m, 5H), 6.90 (dt, *J* = 15.6, 6.7 Hz, 1H), 6.79 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H), 6.38 (d, *J* = 10.1 Hz, 2H), 6.22 (dd, *J* = 15.7, 7.8 Hz, 1H), 3.72 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.70 (c, *J* = 6.1 Hz, 2H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 193.5, 185.2, 154.1, 149.9, 137.8, 134.4, 129.8, 128.7, 128.3, 125.4, 76.2, 62.8, 33.3.

EMAR (ESI+): [M+Na]⁺ calculado para C₁₇H₁₆O₃Na: 291.0999; encontrado: 291.0991.

(E)-5-((4'-Bromo-4-oxo-1,4-dihidro-[1,1'-bifenil]-1-il)oxi)pent-2-enal

9e



El producto se obtuvo a partir de **8e**, siguiendo el procedimiento experimental **2F**. El crudo se purificó mediante CF (6/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite amarillo. **Rdto.**= 55%.

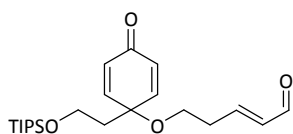
¹H-RMN (CDCl₃) δ: 9.52 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.87 (dt, *J* = 15.0, 6.7 Hz, 1H), 6.72 (d, *J* = 10.1 Hz, 2H), 6.37 (d, *J* = 10.1 Hz, 2H), 6.20 (dd, *J* = 15.6, 7.8 Hz, 1H), 3.69 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.68 (c, *J* = 6.0 Hz, 2H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 193.6, 185.0, 154.1, 149.5, 137.1, 134.5, 131.9, 130.2, 127.4, 122.5, 75.9, 63.0, 33.4.

EMAR (ESI+): [M+Na]⁺ calculado para C₁₇H₁₅BrO₃Na: 369.0105; encontrado: 369.0099.

(E)-5-((4-Oxo-1-(2-((triisopropilsilil)oxi)etil)ciclohexa-2,5-dien-1-il)oxi)pent-2-enal

9f



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **2F**, a partir de **8f**. El crudo se purificó mediante CF (3/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite rojo. **Rdto.**= 34%.

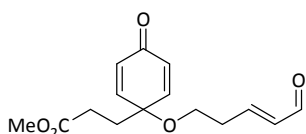
¹H-RMN (CDCl₃) δ: 9.49 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.85-6.74 (m, 3H), 6.29 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H), 6.14 (dd, *J* = 1.4, 7.8 Hz, 1H), 3.77 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.45 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.52 (c, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.94 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.01-0.99 (m, 21H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 193.6, 185.3, 154.3, 150.9, 134.4, 130.5, 74.2, 62.9, 58.1, 43.2, 33.4, 17.9, 11.8.

EMAR (ESI+): [M+H]⁺ calculado para C₂₂H₃₇O₄Si: 393.2383; encontrado: 393.2470.

Propanoato de (E)-metil-3-(4-oxo-1-((5-oxopent-3-en-1-il)oxi)ciclohexa-2,5-dien-1-ilo)

9g



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **2F**, a partir de **8g**. El crudo se purificó mediante CF (4/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite rojo. **Rdto.**= 33%.

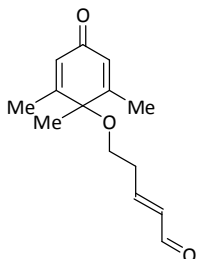
¹H-RMN (CDCl₃) δ: 9.45 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.81-6.71 (m, 1H), 6.67 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H), 6.29 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H), 6.09 (dd, *J* = 15.7, 7.8 Hz, 1H), 3.58 (s, 3H), 3.43 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.50 (c, *J* = 1.0 Hz, 2H), 2.26 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.06 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 193.6, 184.7, 172.9, 154.0, 149.6, 134.4, 131.7, 74.7, 63.2, 51.8, 34.2, 33.3, 28.3.

EMAR (ESI⁺): [M+Na]⁺ calculado para C₁₅H₁₈O₅Na: 301.1054; encontrado: 301.1054.

(E)-5-((1,2,6-Trimetil-4-oxociclohexa-2,5-dien-1-il)oxi)pent-2-enal

9h



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **2F**, a partir de **8h**. El crudo se purificó mediante CF (3/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite amarillo. **Rdto.**= 30%.

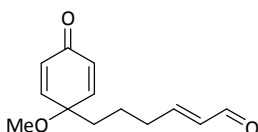
¹H-RMN (CDCl₃) δ: 9.49 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.81 (dt, *J* = 15.7, 6.9 Hz, 1H), 6.20-6.09 (m, 5H), 3.12 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.54 (c, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.97 (s, 6H), 1.38 (s, 3H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 193.9, 185.4, 160.5, 154.5, 134.9, 129.5, 76.6, 62.9, 33.4, 25.1, 18.1.

EMAR (ESI⁺): [M+H]⁺ calculado para C₁₄H₁₉O₃: 235.1328; encontrado: 235.1328.

(E)-6-(1-Metoxi-4-oxociclohexa-2,5-dien-1-il)hex-2-enal

9i



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **2F**, a partir de **8i**. El crudo se purificó mediante CF (3/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite marrón. **Rdto.**= 75%.

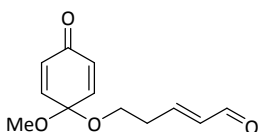
¹H-RMN (CDCl₃) δ: 9.49 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.85–6.66 (m, 3H), 6.38 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H), 6.10 (dd, *J* = 15.7, 7.8 Hz, 1H), 3.21 (s, 3H), 2.33 (c, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.75 (dd, *J* = 11.2, 5.8 Hz, 2H), 1.56–1.42 (m, 2H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 194.1, 185.5, 157.3, 150.9, 133.8, 132.1, 75.7, 53.5, 39.3, 32.9, 22.3.

EMAR (ESI⁺): [M+Na]⁺ calculado para C₁₃H₁₆O₃Na: 243.0997; encontrado: 243.1000.

(E)-5-((1-Metoxi-4-oxociclohexa-2,5-dien-1-il)oxi)pent-2-enal

9k



El producto fue obtenido siguiendo el procedimiento experimental **2F**, a partir de **8k**. El crudo se purificó mediante CF (3/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite amarillo. **Rdto.**= 53%.

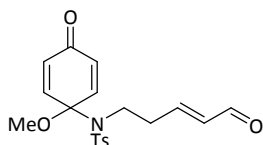
¹H-RMN (CDCl₃) δ: 9.47 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.75 (m, 3H), 6.26 (d, *J* = 10.3 Hz, 2H), 6.16 (dd, *J* = 15.7, 7.8 Hz, 1H), 3.71 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.31 (s, 3H), 2.59 (m, 2H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 193.5, 184.8, 153.9, 143.1, 134.3, 130.0, 92.5, 60.6, 50.5, 32.9.

EMAR (EI⁺): [M]⁺ calculado para C₁₂H₁₄O₄: 222.0892; encontrado: 222.0895.

(E)-N-(1-Metoxi-4-oxociclohexa-2,5-dien-1-il)-4-metil-N-(5-oxopent-3-en-1-il) bencenosulfonamida

9i



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **2F**, a partir de **8i**. El crudo se purificó mediante CF (2/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un sólido verde. En este caso solo fue necesario adicionar una carga de catalizador (1 mol%). **Rdto.**= 54%, **P.f. (°C)**= 123.7-124.0.

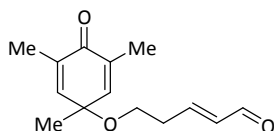
¹H-RMN (CDCl₃) δ: 9.51 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.84 (dt, *J* = 15.5, 6.8 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 10.3 Hz, 2H), 6.26-6.08 (m, 3H), 3.56 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 3.15 (s, 3H), 2.81 (c, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.40 (s, 3H).

¹³CRMN (CDCl₃) δ: 193.6, 184.0, 153.9, 143.9, 143.7, 138.2, 134.1, 130.5, 129.4, 127.4, 84.6, 51.3, 44.4, 35.2, 21.5.

EMAR (ESI⁺): [M+Na]⁺ calculado para C₁₉H₂₁NO₅SNa: 398.1140; encontrado: 398.1045.

(E)-5-((1,3,5-Trimetil-4-oxociclohexa-2,5-dien-1-il)oxi)pent-2-enal

9o



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **2F**, a partir de **8o**. El crudo se purificó mediante CF (3/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite amarillo. **Rdto.**= 63%.

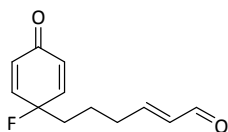
¹H-RMN (CDCl₃) δ: 9.51 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.77 (dt, *J* = 15.7, 6.7 Hz, 1H), 6.48 (s, 2H), 6.15 (dd, *J* = 15.7, 7.8 Hz, 1H), 3.40 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.51 (c, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.89 (s, 6H), 1.36 (s, 3H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 193.8, 154.8, 147.8, 136.7, 136.5, 72.4, 62.7, 33.5, 30.8, 28.7.

EMAR (ESI⁺): [M+Na]⁺ calculado para C₁₄H₁₈O₃Na: 257.2809; encontrado: 257.1158.

(E)-6-(1-fluoro-4-oxociclohexa-2,5-dien-1-il)hex-2-enal

9j



La ciclohexadienona **9j** fue sintetizada mediante un procedimiento one-pot, en dos etapas (oxidación con Selectfluor^{TM,73} y posterior metátesis siguiendo el procedimiento experimental **2F**) a partir del fenol **7i**. Para ello, sobre una disolución de **7i** (1.24 mmol) en CH₃CN (12.4 mL) se

añaden 1.24 mmol de F-TEDA-BF₄. La mezcla se agita a t.a. y se monitoriza mediante TLC hasta el total consumo de **7i**. Entonces el disolvente se elimina a presión reducida y el crudo se disuelve en CH₂Cl₂. El material insoluble se filtra y el filtrado se lava con H₂O, se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida. A continuación en

un tubo sellado bajo atmósfera de Ar, 0.01 mmol del residuo seco obtenido se disuelven en CH_2Cl_2 anhidro (2.5 mL) y sobre esta disolución se añade crotonaldehído (0.5 mmol) para posteriormente llevar a cabo la reacción de metátesis según se describe en el procedimiento experimental **2F**. El crudo resultante se purificó mediante CF (3/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite amarillo. **Rdto. global**= 6%.

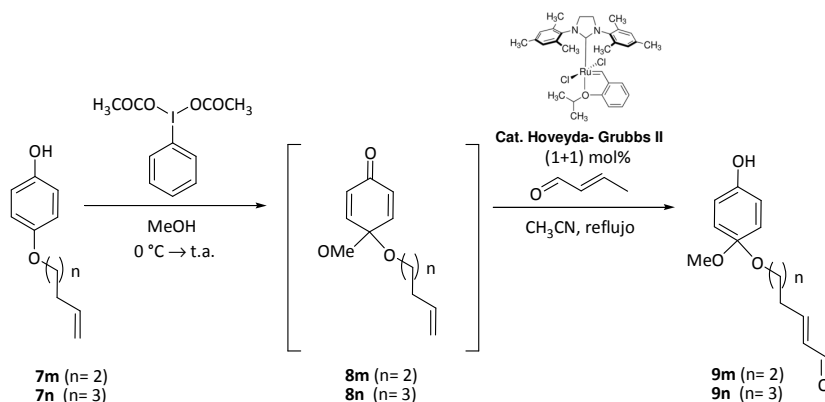
^1H -RMN (CDCl_3) δ : 9.51 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.90–6.84 (m, 2H), 6.81–6.74 (m, 1H), 6.29–6.24 (m, 2H), 6.12 (dd, J = 15.7, 7.8 Hz, 1H), 2.39–1.91 (m, 4H), 1.63–1.56 (m, 2H).

^{13}C -RMN (CDCl_3) δ : 194.0, 184.9 ($J_{\text{C-F}}$ = 5.4 Hz), 156.6, 145.7 ($J_{\text{C-F}}$ = 21.7 Hz), 134.0, 129.9 ($J_{\text{C-F}}$ = 8.2 Hz), 88.9 ($J_{\text{C-F}}$ = 164.9 Hz), 38.5 ($J_{\text{C-F}}$ = 25.7 Hz), 32.6, 22.1 ($J_{\text{C-F}}$ = 5.4 Hz).

^{19}F -RMN (CDCl_3) δ : -149.6 (s).

Procedimiento Experimental 2G: Síntesis de las ciclohexadienonas **9m** y **9n**

Las ciclohexadienonas **9m** y **9n** fueron sintetizadas mediante un procedimiento “one-pot”, en dos etapas, según se indica en el esquema 2.25. En primer lugar se llevó a cabo la desaromatización oxidativa de los alquenos **7m** y **7n**, siguiendo el procedimiento experimental **2E**. Los productos de estas reacciones no se aislaron, siendo los crudos tratados según el procedimiento experimental **2F**. Los crudos finales resultantes fueron purificados mediante CF (el eluyente se indica en cada caso).

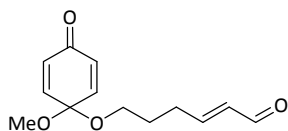


Esquema 2.25

Secuencia para la síntesis de las ciclohexadienonas **9m** y **9n**.

(E)-6-((1-Metoxi-4-oxociclohexa-2,5-dien-1-il)oxi)hex-2-enal

9m



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **2G**, a partir de **7m**. El crudo se purificó mediante CF (3/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite marrón. **Rdto.**= 69%.

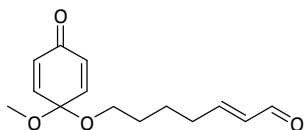
¹H-RMN (CDCl₃) δ : 9.50 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.90–6.75 (m, 3H), 6.26 (d, J = 10.4 Hz, 2H), 6.12 (dd, J = 15.6, 7.8 Hz, 1H), 3.60 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 3.34 (s, 3H), 2.56–2.36 (m, 2H), 1.92–1.72 (m, 2H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ : 194.1, 185.3, 157.7, 143.8, 133.6, 130.4, 92.9, 62.2, 50.9, 28.5, 22.6.

EMAR (EI+): [M]⁺ calculado para C₁₃H₁₆O₄: 236.1049; encontrado: 236.1041.

(E)-7-((1-Metoxi-4-oxociclohexa-2,5-dien-1-il)oxi)hept-2-enal

9n



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **2G**, a partir de **7n**. El crudo se purificó mediante CF (3/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite marrón. **Rdto.**= 74%.

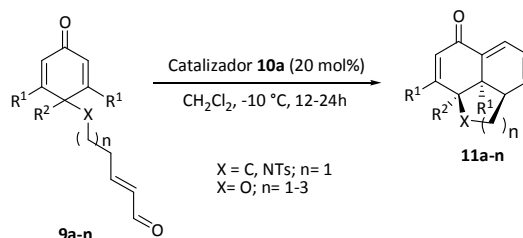
¹H-RMN (CDCl₃) δ : 9.51 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 6.91–6.76 (m, 3H), 6.28 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 6.13 (dd, J = 15.6, 7.8 Hz, 1H), 3.66–3.56 (m, 2H), 3.36 (s, 3H), 2.43–2.32 (m, 2H), 1.71–1.56 (m, 4H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ : 194.3, 185.4, 158.2, 144.0, 133.6, 130.4, 92.9, 62.8, 50.9, 32.7, 29.8, 24.8.

EMAR (ESI+): [M+H]⁺ calculado para C₁₄H₁₉O₄: 251.1277; encontrado: 251.1271.

2.5.4.2 Síntesis de los derivados tricíclicos 11a-o

Procedimiento Experimental 2H: Síntesis intramolecular de los derivados tricíclicos 11a-o, mediante catálisis vía dienamina

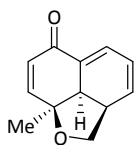


Esquema 2.26

Síntesis de los derivados tricíclicos **11a-n**.

Sobre una disolución del catalizador **10a** (20 mol%) en CH_2Cl_2 (0.05 mL) a $-10\text{ }^\circ\text{C}$, se añade una disolución de la ciclohexadienona **9** correspondiente (0.1 mmol) en CH_2Cl_2 (0.05 mL), a la misma temperatura. La reacción se monitoriza mediante TLC hasta observarse el consumo del material de partida y el crudo se purifica mediante CF.

(2aR, 2a¹R, 8aS)-8a-Metil-2a¹, 8a-dihidro-2H-nafto[1,8-bc]furan-6(2aH)-ona 11a



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **2H**, como un aceite naranja, a partir de **9a**. El crudo se purificó mediante CF (3/1 hexano:AcOEt) y el ee se determinó mediante SFC (columna Chiralpak IA, CO_2/MeOH 90:10, flujo= 1.0 mL/min, $\tau_{\text{menor}} = 3.2$ min, $\tau_{\text{mayor}} = 3.8$ min).

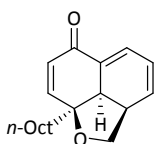
Rdto.= 66%. **ee**= 96%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +120.0$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2).

¹H-RMN (CDCl_3) δ : 6.88 (m, 1H), 6.79 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 6.16 (m, 3H), 4.13 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 3.77-3.37 (m, 1H), 3.28-3.20 (m, 2H), 1.46 (s, 3H).

¹³C-RMN (CDCl_3) δ : 187.0, 149.4, 130.2, 129.6, 128.6, 127.7, 124.5, 80.4, 71.3, 44.2, 38.2, 28.5.

EMAR (EI+): $[M]^+$ calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_2$: 188.0837; encontrado: 188.0838.

(2aR, 2a¹R, 8aS)-8a-Octil-2a¹, 8a-dihidro-2H-nafto[1,8-bc]furan-6(2aH)-ona 11b



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **2H**, como un aceite naranja, a partir de **9b**. El crudo se purificó mediante CF (15/1 hexano:AcOEt) y el ee se determinó mediante SFC (columna Chiralpak IB, CO_2/MeOH 90:10, flujo= 2.0 mL/min, $\tau_{\text{menor}} = 3.8$ min, $\tau_{\text{mayor}} = 4.1$ min).

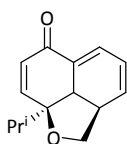
Rdto.= 77%. **ee**= 93%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +50.0$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2).

¹H-RMN (CDCl_3) δ : 6.83 (m, 1H), 6.75 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 6.20-6.04 (m, 3H), 4.05 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 3.60 (dd, $J = 10.7, 7.7$ Hz, 1H), 3.31 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 3.13 (m, 1H), 1.65 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.24 (s, 12H), 0.85 (t, $J = 6.2$ Hz, 3H).

¹³C-RMN (CDCl_3) δ : 187.3, 149.0, 130.4, 129.9, 128.5, 128.1, 124.5, 83.3, 70.4, 41.4, 41.2, 38.3, 31.8, 29.9, 29.4, 29.1, 25.1, 22.6, 14.0.

EMAR (ESI+): $[M+H]^+$ calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{O}_2$: 287.2005; encontrado 287.2006.

(2aR, 8aS)-8a-Isopropil-2a¹, 8a-dihidro-2H-nafto[1,8-bc]furan-6(2aH)-ona 11c



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **2H**, como un aceite naranja, a partir de **9c**. El crudo se purificó mediante CF (15/1 hexano:AcOEt) y el ee se determinó mediante SFC (columna Chiralpak IA,

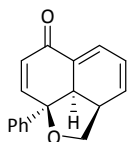
CO₂/MeOH 90:10, flujo= 2.0 mL/min, τ_{menor} = 6.7 min, τ_{mayor} = 7.1 min). **Rdto.**= 71%. **ee**= 96%. $[\alpha]_D^{20}$ = +136.2. (c = 1.0, CH₂Cl₂).

¹H-RMN (CDCl₃) δ : 6.79 (m, 2H), 6.23 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 6.22-6.15 (m, 1H), 6.05 (m, 1H), 4.04 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 3.60 (dd, J = 10.9, 7.8 Hz, 1H), 3.36 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 3.13-3.02 (m, 1H), 1.88 (sp, J = 6.9 Hz, 1H), 1.02 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.88 (d, J = 6.9 Hz, 3H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ : 187.6, 147.1, 131.0, 129.7, 128.3, 124.4, 86.0, 70.1, 39.8, 38.7, 36.7, 18.8, 16.8.

EMAR (ESI+): $[M+H]^+$ calculado para C₁₄H₁₇O₂: 217.1223; encontrado 217.1227.

(2aR, 2a¹R, 8aS)-8a-Fenil-2a¹, 8a-dihidro-2H-nafto[1,8-bc]furan-6(2aH)-ona **11d**



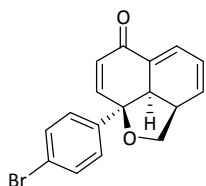
El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **2H** pero a una temperatura de -20 °C, como un sólido naranja, a partir de **9d**. El crudo se purificó mediante CF (10/1 hexano:AcOEt) y el ee se determinó mediante SFC (columna Chiralpak IB, CO₂/MeOH 90:10, flujo= 3.0 mL/min, τ_{menor} = 3.2 min, τ_{mayor} = 3.4 min). **Rdto.**= 77%. **P.f.** (°C)= 138.3-138.9. **ee**= 95%. $[\alpha]_D^{20}$ = +214.5 (c = 1.0, CH₂Cl₂).

¹H-RMN (CDCl₃) δ : 7.38-7.29 (m, 5H), 7.00-6.96 (m, 1H), 6.76 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 6.30 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 6.20 (dd, J = 9.5, 5.3 Hz, 1H), 6.10-6.05 (m, 1H), 4.35 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 3.87 (dd, J = 10.7, 7.6 Hz, 1H), 3.60 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 2.94 (m, 1H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ : 186.6, 148.1, 145.1, 130.7, 130.3, 129.1, 128.4 (2xCH), 127.6, 125.0, 124.6, 84.6, 72.3, 47.0, 36.9.

EMAR (ESI+): $[M+H]^+$ calculado para C₁₇H₁₅O₂: 251.0994; encontrado: 251.1070.

(2aR, 2a¹R, 8aS)-8a-(4-Bromofenil)-2a¹, 8a-dihidro-2H-nafto[1,8-bc]furan-6(2aH)-ona **11e**



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **2H** pero a una temperatura de -20 °C, como un sólido rojo, a partir de **9e**. El crudo se purificó mediante CF (3/1 hexano:AcOEt) y el ee se determinó mediante SFC (columna Chiralpak IB, CO₂/MeOH 90:10, flujo= 3.0 mL/min, τ_{menor} = 4.7 min, τ_{mayor} = 5.1 min). **Rdto.**= 66%. **P.f.** (°C)= 130.4-130.9. **ee**= 92%. $[\alpha]_D^{20}$ = +95.0 (c = 1.0, CH₂Cl₂).

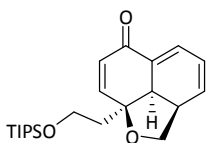
¹H-RMN (CDCl₃) δ : 7.48 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.26 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.05-6.94 (m, 1H), 6.69 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 6.30 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 6.19 (dd, J = 9.4, 5.4 Hz, 1H), 6.06 (m, 1H), 4.30 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 3.83 (dd, J = 10.7, 7.6 Hz, 1H), 3.54 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 2.88 (m, 1H).

^{13}C -RMN (CDCl_3) δ : 186.3, 147.3, 144.3, 131.5, 130.6, 130.5, 129.3, 127.3, 126.9, 124.7, 121.7, 84.3, 72.3, 47.0, 36.9.

EMAR (ESI+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{BrO}_2$: 329.0099; encontrado: 329.0171.

2aR, 2a¹R, 8aS)-8a-(2-((Triisopropilsilil)oxi)etil)-2a¹, 8a-dihidro-2H-nafto [1, 8-bc]furan-6(2aH)-ona

11f



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **2H**, como un aceite amarillo, a partir de **9f**. El crudo se purificó mediante CF (10/1 hexano:AcOEt) y el ee se determinó mediante SFC (columna Chiralpak IA, CO_2/MeOH 90:10, flujo= 2.0 mL/min, $\tau_{\text{menor}} = 7.7$ min, $\tau_{\text{mayor}} = 7.0$ min). **Rdto.**= 55%. **ee**= 98%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +62.7$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2).

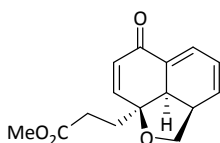
^1H -RMN (CDCl_3) δ : 6.89-6.86 (m, 2H), 6.20-6.06 (m, 3H), 4.06 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 3.81-3.77 (m, 2H), 3.63-3.57 (m, 2H), 3.22-3.17 (m, 1H), 2.03-1.88 (m, 2H), 1.05-0.99 (m, 21H).

^{13}C -RMN (CDCl_3) δ : 186.1, 147.7, 129.3, 128.9, 127.4, 127.1, 123.5, 81.4, 69.4, 58.4, 42.5, 41.3, 37.1, 16.9, 10.8.

EMAR (ESI+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $[\text{M}+\text{H}]^+ \text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{O}_3\text{Si}$: 374.2277; encontrado: 375.2358.

3-((2aR, 2a¹R, 8aS)-6-oxo-2a, 2a¹, 6, 8a-tetrahidro-2H-nafto[1, 8-bc]furan-8a-il)propanoato de metilo

11g



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **2H**, como un aceite rojo, a partir de **9g**. El crudo se purificó mediante CF (2/1 hexano:AcOEt) y el ee se determinó mediante SFC (columna Chiralpak IA, CO_2/MeOH 90:10, flujo= 3.0 mL/min, $\tau_{\text{menor}} = 6.0$ min, $\tau_{\text{mayor}} = 5.2$ min). **Rdto.**= 58%. **ee**= 95%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +89.2$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2).

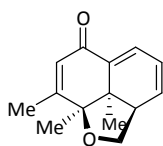
^1H -RMN (CDCl_3) δ : 6.89 (m, 1H), 6.79 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 6.24-6.10 (m, 3H), 4.07 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.67-3.60 (m, 1H), 3.31-3.17 (m, 2H), 2.49-2.31 (m, 2H), 2.18-1.94 (m, 2H).

^{13}C -RMN (CDCl_3) δ : 186.8, 173.3, 146.8, 130.7, 130.1, 128.9, 127.4, 124.5, 82.1, 71.0, 51.8, 42.6, 38.0, 35.6, 29.1.

EMAR (ESI+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{O}_4$: 261.1049; encontrado: 261.1128.

(2a*R*, 2a¹*R*, 8a*S*)-2a¹, 8, 8a-Trimetil-2a¹, 8a-dihidro-2*H*-nafto[1, 8-*bc*]furan-6(2a*H*)-ona

11h



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **2H** pero en un tiempo de 48 horas, como un sólido amarillo, a partir de **9h**. El crudo se purificó mediante CF (3/1 hexano:AcOEt) y el ee se determinó mediante SFC (columna Chiralpak IA, CO₂/MeOH 90:10, flujo= 3.0 mL/min, $\tau_{\text{menor}} = 4.7$ min, $\tau_{\text{mayor}} = 5.5$ min). **Rdto.**= 54%. **P.f. (°C)**= 82.4-82.7. **ee**= 74%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +66.6$ ($c = 0.5$, CH₂Cl₂).

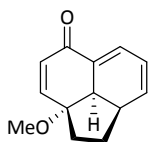
¹H-RMN (CDCl₃) δ : 6.91-6.88 (m, 1H), 6.23 (dd, $J = 9.4, 5.4$ Hz, 1H), 6.14-6.05 (m, 2H), 4.12 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 3.50 (dd, $J = 10.3, 7.8$ Hz, 1H), 3.08-2.95 (m, 1H), 2.06 (s, 3H), 1.34 (s, 3H), 1.05 (s, 3H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ : 187.0, 158.9, 135.3, 130.3, 128.5, 127.0, 124.3, 85.4, 71.0, 46.4, 44.8, 22.5, 21.3, 20.0.

EMAR (FAB+): $[M+H]^+$ calculado para C₁₄H₁₇O₂: 217.1229; encontrado: 217.1219.

(2a*R*, 2a¹*R*, 8a*R*)-2a-Metoxi-1, 2, 2a, 8a-tetrahidroacenaftilen-5(2a¹*H*)-ona

11i



El producto se obtuvo como un aceite amarillo a partir de **9i** siguiendo el procedimiento experimental **2H**, a 0 °C y en 12 h. El crudo se purificó mediante CF (7/1 hexano:AcOEt) y el ee se determinó mediante SF-HPLC (columna Chiralpak IA, CO₂/MeOH 90:10, flujo= 3.0 mL/min, $\tau_{\text{menor}} = 2.7$ min, $\tau_{\text{mayor}} = 2.7$ min). **Rdto.**= 54%. **ee**= 86%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -0.5$ ($c = 1.0$, CH₂Cl₂).

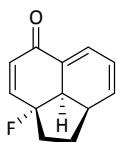
¹H-RMN (CDCl₃) δ : 7.05-6.98 (m, 2H), 6.33-6.23 (m, 1H), 6.18 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H), 6.06 (dd, $J = 9.3, 5.6$ Hz, 1H), 3.51 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 3.29 (s, 3H), 3.07-2.91 (m, 1H), 2.20-1.99 (m, 2H), 1.84-1.63 (m, 2H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ : 186.4, 152.4, 137.0, 131.7, 130.5, 128.6, 122.3, 88.2, 52.2, 43.3, 39.3, 36.8, 30.9.

EMAR (EI+): $[M]^+$ calculado para C₁₃H₁₄O₂: 202.0994; encontrado 202.0998.

(2a*R*, 2a¹*R*, 8a*R*)-2a-Fluoro-1, 2, 2a, 8a-tetrahidroacenaftilen-5(2a¹*H*)-ona

11j



El producto se obtuvo como un aceite amarillo a partir de **9j**, siguiendo el procedimiento experimental **2H** a 0 °C y en 4h. El crudo se purificó mediante CF (6/1 hexano:AcOEt) y el ee se determinó mediante SFC (columna Chiralpak IA, CO₂/MeOH 90:10, flujo= 2.0 mL/min, $\tau_{\text{menor}} = 3.5$ min, $\tau_{\text{mayor}} = 3.8$ min). **Rdto.**= 57%. **ee**= 82%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +2.1$ ($c = 0.3$, CH₂Cl₂).

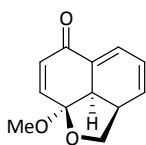
¹H-RMN (CDCl₃) δ: 7.23–7.08 (m, 2H), 6.50–6.39 (m, 1H), 6.25–6.16 (m, 2H), 3.64–3.47 (m, 1H), 3.30–3.18 (m, 1H), 2.47–2.22 (m, 2H), 0.93–0.72 (m, 4H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 185.9 (*J*_{C-F} = 2.6 Hz), 147.6 (*J*_{C-F} = 29.0 Hz), 137.0, 130.6 (*J*_{C-F} = 2.0 Hz), 130.2 (*J*_{C-F} = 9.5 Hz), 126.4 (*J*_{C-F} = 11.7 Hz), 122.4, 104.3 (*J*_{C-F} = 173.9 Hz), 48.2 (*J*_{C-F} = 23.1 Hz), 37.8 (*J*_{C-F} = 26.1 Hz), 37.1 (*J*_{C-F} = 1.3 Hz), 30.0.

¹⁹F-RMN (CDCl₃) δ: -138.0.

EMAR (EI+): [M]⁺ calculado para C₁₂H₁₁FO: 190.0794; encontrado 190.0793.

(2aR, 2a¹R, 8aS)-8a-Metoxi-2a¹, 8a-dihidro-2H-nafto[1, 8-bc]furan-6(2aH)-ona **11k**



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **2H**, como un sólido rojo, a partir de **9k**. El crudo se purificó mediante CF (3/1 hexano:AcOEt) y el ee se determinó mediante SFC (columna Chiralpak IA, CO₂/MeOH 90:10, flujo= 3.0 mL/min, τ_{menor} = 2.8 min, τ_{mayor} = 2.6 min).

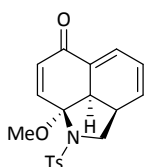
Rdto. = 88%. **P.f. (°C)** = 149.8–150.2. **ee** = 89%. **[α]²⁰_D** = +1.3 (*c* = 1.0, CH₂Cl₂).

¹H-RMN (CDCl₃) δ: 7.00 (m, 2H), 6.17 (m, 3H), 4.25 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.80 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H), 3.44 (m, 5H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 186.2, 140.7, 131.1, 131.0, 129.4, 126.6, 123.8, 105.3, 74.0, 49.1, 46.1, 36.0.

EMAR (EI+): [M]⁺ calculado para C₁₂H₁₂O₃: 204.0786; encontrado: 204.0781.

(2aR, 2a¹R, 8aR)-8a-Metoxi-1-tosil-1, 2, 2a, 8a-tetrahidrobenzo[cd]indol-6(2a¹H)-ona **11l**



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento experimental **2H**, como un aceite naranja, a partir de **9l**. El crudo se purificó mediante CF (3/1 hexano:AcOEt) y el ee se determinó mediante SFC (columna Chiralpak IA, CO₂/MeOH 90:10, flujo= 1.0 mL/min, τ_{menor} = 26.2 min, τ_{mayor} = 24.4 min).

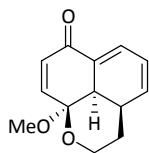
Rdto. = 64%. **ee** = 92%. **[α]²⁰_D** = +116.0 (*c* = 1.1, CH₂Cl₂).

¹H-RMN (CDCl₃) δ: 7.62 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.41 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.88–6.82 (m, 1H), 6.27 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 6.21–6.09 (m, 2H), 3.73 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.46 (s, 3H), 3.39 (dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 3.23–3.15 (m, 1H), 3.12–3.03 (m, 1H), 2.39 (s, 3H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 184.9, 143.7, 143.2, 135.5, 131.9, 130.8, 130.0, 129.3, 127.7, 125.6, 124.6, 94.3, 53.5, 51.5, 46.4, 33.0, 21.5.

EMAR (ESI+): [M+Na]⁺ calculado para C₁₉H₁₉NO₄SNa: 380.1035; encontrado: 380.0941.

(3aR, 3a¹R, 9aS)-9a-Metoxi-3, 3a, 3a¹, 9a-tetrahydrobenzo[de]cromen-7(2H)-ona 11m



El producto se obtuvo a partir de **9m** como un aceite amarillo, siguiendo el procedimiento experimental **2H**, empleando además ácido benzoico (20 mol%) y multiplicando por siete la dilución (0.70 mL de CH₂Cl₂) para evitar la polimerización del material de partida. El crudo se purificó mediante CF (7/1 hexano:AcOEt) y el ee se determinó mediante SFC (columna Chiralpak

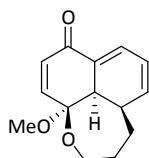
IA, CO₂/MeOH 90:10, flujo= 3.0 mL/min, τ_{menor} = 3.0 min, τ_{mayor} = 3.7 min). **Rdto.**= 85%. **ee**= 96%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = +75.3 (c = 1.4, CH₂Cl₂).

¹H-RMN(CDCl₃) δ : 7.18-7.12 (m, 1H), 6.94 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 6.25 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 6.18 (c, J = 4.4 Hz, 2H), 3.85–3.62 (m, 2H), 3.38 (s, 3H), 3.06–2.94 (m, 1H), 2.92-2.77 (m, 1H), 1.74–1.59 (m, 1H), 1.39–1.29 (m, 1H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ : 185.9, 141.6, 137.4, 131.9, 131.7, 128.4, 123.9, 93.9, 62.0, 48.2, 39.1, 29.4, 24.9.

EMAR (EI+): $[M]^+$ calculado para C₁₃H₁₄O₃: 218.0943; encontrado: 218.0936.

(4aR, 4a¹R, 10aS)-10a-Metoxi-4, 4a, 4a¹, 10a-tetrahidro-2H-nafto[1, 8-bc]oxepin-8(3H)-ona 11n



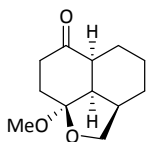
El producto se obtuvo a partir de **9n**, como un aceite amarillo, siguiendo el procedimiento experimental **2H**, empleando además ácido benzoico (20 mol%) y multiplicando por siete la dilución (0.70 mL de CH₂Cl₂) para evitar la polimerización del material de partida, y a t.a. El crudo se purificó mediante CF (6/1 hexano:AcOEt) y el ee se determinó mediante SFC

(columna Chiralpak IB, CO₂/MeOH 90:10, flujo= 3.0 mL/min, τ_{menor} = 3.5 min, τ_{mayor} = 3.7 min). **Rdto.**= 63%. **ee**= 98%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = -50.2 (c = 1.7, CH₂Cl₂).

¹H-RMN (CDCl₃) δ : 7.20–7.05 (m, 1H), 6.75 (d, J = 10.6 Hz, 1H), 6.40 (dd, J = 9.1, 7.0 Hz, 1H), 6.34 (d, J = 10.6 Hz, 1H), 6.14 (dd, J = 9.3, 5.4 Hz, 1H), 3.83 (dt, J = 12.7, 4.7 Hz, 1H), 3.52–3.40 (m, 4H), 3.27 (ddd, J = 12.2, 7.0, 5.0 Hz, 1H), 2.86–2.73 (m, 1H), 1.75–1.50 (m, 4H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ : 185.5, 142.7, 142.2, 132.3, 131.5, 129.2, 123.1, 98.5, 63.4, 49.7, 47.1, 34.4, 29.3, 24.4.

EMAR (EI+): $[M]^+$ calculado para C₁₄H₁₆O₃: 232.1099; encontrado: 232.1092.

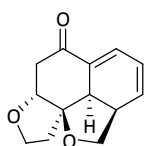
(2aR, 2a¹R, 5aS, 8aS)-8a-Metiloctahidro-2H-nafto[1, 8-bc]furan-6(2aH)-ona**12**

Sobre un matraz seco bajo atmósfera de Ar se añade Pd(C) 5 mol% (0.0015 mmol) y una disolución de **11a** (0.028 mmol) en AcOEt (26.7 mL). La suspensión resultante se burbujea con H₂ y se mantiene en agitación a t.a. bajo atmósfera de H₂ durante 5 h. La reacción se monitoriza mediante ¹H-RMN y, tras el consumo del material de partida, el crudo se filtra a través de celita y se purifica mediante CF (1/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite amarillo claro. **Rdto.**= 95%. **dr**> 98:2. [α]_D²⁰= +100.7 (c = 1.7, CH₂Cl₂).

¹H-RMN (CDCl₃): δ 3.82 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 3.37 (dd, J = 11.1, 8.5 Hz, 1H), 2.72-2.61 (m, 1H), 2.58-2.37 (m, 3H), 2.31-2.20 (m, 2H), 2.14-1.98 (m, 2H), 1.63-1.06 (m, 5H), 1.29 (s, 3H).

¹³C-RMN (CDCl₃): δ : 214.3, 82.2, 70.4, 47.3, 43.2, 36.9, 34.4, 32.5, 28.2, 23.1, 23.0, 16.6.

EMAR (EI+): [M]⁺ calculado para C₁₂H₁₈O₂: 194.1307; encontrado: 194.1316.

(3aR, 3a¹R, 5aR, 10aR)-2, 3, 5, 5a, 10, 10a-Hexahidronafto[2,1-b:1, 8-b'c]difuran-9(3a¹H)-ona**13**

Un vial Nalgene[®] scintillation que contiene **11f** (0.026 mmol) en THF (1 mL, 0.026 M) es enfriado a 0 °C en baño de hielo y posteriormente se añade HF-piridina (70%, 0.1 mL) lentamente. Tras la adición, se retira el baño de hielo y la disolución se agita durante 3h. Después, la reacción se vierte gota a gota en un vaso de precipitados que contiene disolución saturada de NaHCO₃ (6 mL). La mezcla bifásica se diluye con H₂O (4 mL) y se extrae con CH₂Cl₂ (3x4 mL). Las fases orgánicas se mezclan, se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evapora a presión reducida. El residuo se purifica mediante CF (1/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite incoloro. **Rdto.**= 61%. **dr**> 98:2. [α]_D²⁰= -28.4 (c = 0.3, CH₂Cl₂).

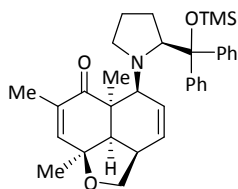
¹H-RMN (CDCl₃): δ : 6.90 (m, 1H), 6.19 (m, 2H), 4.11 (m, 2H), 3.91 (m, 1H), 3.64 (dd, J = 9.9, 8.1 Hz, 1H), 3.47 (c, J = 6.9 Hz, 1H), 3.37 (m, 1H), 3.15 (m, 1H), 2.85 (dd, J = 15.0, 5 Hz, 1H), 2.35 (dd, J = 15.0, 5 Hz, 1H), 2.21 (m, 1H), 1.95 (m, 1H).

¹³C-RMN (CDCl₃): δ : 197.6, 132.7, 128.6, 127.6, 123.5, 93.6, 81.4, 73.2, 67.3, 44.8, 43.3, 39.3, 38.6.

EMAR (EI+): [M]⁺ calculado para C₁₃H₁₄O₃: 218.0943; encontrado: 218.0953.

5-((S)-2-(Difenil((trimetilsilil)oxi)metil)pirrolidin-1-il)-5a, 7, 8a-trimetil-2a¹, 5, 5a, 8a-tetrahidro-2H-nafto[1, 8-bc]furan-6(2aH)-ona

14



Sobre una disolución del catalizador **10a** (20 mol%) en CH₂Cl₂ (0.05 mL) se añade una disolución del aldehído **9o** (0.1mmol) en CH₂Cl₂ (0.05 mL), a la misma temperatura. La reacción se monitoriza mediante TLC hasta el consumo del material de partida y el crudo se purifica mediante CF (20/1 hexano:AcOEt), obteniéndose el producto como un aceite amarillo. **Rdto.**= 15%.

¹H-RMN (CDCl₃) δ: 7.44-7.42 (m, 5H), 7.29-7.25 (m, 5H), 6.03 (s, 1H), 5.74-5.72 (m, 1H), 5.53-5.51 (m, 1H), 4.32-4.29 (m, 2H), 3.90 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H), 2.89 (dd, *J* = 11.3, 8.7 Hz, 1H), 2.67-2.61 (m, 2H), 2.50-2.41 (m, 1H), 2.25-2.21 (m, 1H), 1.92-1.86 (m, 2H), 1.73 (s, 3H), 1.47 (s, 3H), 1.25 (s, 3H), 0.97-0.82 (m, 2H), 0.71-0.60 (m, 1H), -0.14 (s, 9H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 202.8, 146.2, 142.7, 134.8, 132.4, 130.4, 130.0, 129.8, 129.3, 128.9, 128.2, 127.1, 127.0, 126.9, 85.6, 79.0, 71.1, 68.7, 65.9, 49.3, 44.3, 41.0, 29.7, 27.8, 25.2, 23.4, 16.5, 2.4.

EMAR (ESI⁺): [M+H]⁺ calculado para C₃₄H₄₄NO₃Si: 542.3012; encontrado: 542.3065.

2.5.5 Asignación estructural compuesto **11f**

Los cristales del compuesto **11f** se montaron en aceite inerte sobre una fibra de vidrio. Los datos fueron recogidos en un difractómetro Bruker X8 APPEX II CCD, equipado con un grafito monocromado MoKα (fuente de radiación: λ = 0.71073 Å). Los datos del cristal y los datos recogidos se presentan en las tablas 2.3 y 2.4-2.5, respectivamente.^b Los datos fueron integrados usando SAINT^g y se llevó a cabo una corrección de absorción con el programa SADABS.^h Las estructuras fueron resueltas mediante métodos directos usando SHELXTLⁱ y refinadas mediante la matriz completa de mínimos cuadrados basándose en *F*². Todos los átomos de hidrógeno se calcularon y refinaron con un factor de temperatura isotrópica global mediante un modelo de conducción.

^g SAINT+ v7.12a. Area-Detector Integration Program. Bruker-Nonius AXS. Madison, Wisconsin, USA, 2004.

^h G. M. Sheldrick, SADABS version 2004/1. A Program for Empirical Absorption Correction. University of Göttingen, Göttingen, Germany, 2004.

ⁱ SHELXTL-NT version 6.12. Structure Determination.

Tabla 2.3

Datos cristalográficos del compuesto **11f**.

Fórmula empírica	C ₁₇ H ₁₃ BrO ₂	Volumen (Å³)	1461.67(4)
Peso molecular	329.18	Densidad calculada	1.496 (mg/cm ³)
Longitud de onda (Å)	0.71073	Coefficiente de absorción	2.810 (mm ⁻¹)
Sistema cristalino	Ortorrómbico	F(000)	664
Grupo espacial	P 21 21 21	Reflexiones recogidas	26569
Z	4	Reflexiones observadas	4837
Parámetros celdilla	a (Å) 8.01050(10)	Transmisión max. y min	0.6466 y 0.3994
	b (Å) 9.3460(2)	Índices R finales [I > 2 σ (I)]:	
	c (Å) 19.5238(3)	R1	0.0312
	α (°) 90	wR2	0.0925
	β (°) 90	Bondad del ajuste, S	1.001
	γ (°) 90		

Tabla 2.4

Longitudes de enlace del compuesto **11f**.

Entrada	Átomos	Longitud de enlace (Å)	Entrada	Átomos	Longitud de enlace (Å)
1	Br1-C1	1.898(3)	13	C1-C2	1.370(5)
2	C1-C6	1.377(5)	14	C2-C3	1.379(5)
3	C3-C4	1.395(5)	15	C4-C5	1.391(4)
4	C4-C7	1.524(4)	16	C5-C6	1.378(5)
5	C7-O2	1.444(3)	17	C7-C8	1.512(4)
6	C7-C16	1.529(4)	18	C8-C9	1.322(5)
7	C9-C10	1.472(5)	19	C10-O1	1.212(4)
8	C10-C11	1.469(4)	20	C11-C12	1.333(5)
9	C11-C16	1.510(4)	21	C12-C13	1.452(5)
10	C13-C14	1.330(5)	22	C14-C15	1.498(5)
11	C15-C17	1.525(5)	23	C15-C16	1.533(4)
12	C17-O2	1.439(4)			

Tabla 2.5

Ángulos de enlace del compuesto **11f**.

Entrada	Átomos	Longitud de enlace (Å)	Entrada	Átomos	Longitud de enlace (Å)
1	C2-C1-C6	121.0(3)	19	C2-C1-Br1	119.5(3)
2	C6-C1-Br1	119.6(3)	20	C1-C2-C3	119.5(3)
3	C2-C3-C4	120.9(3)	21	C5-C4-C3	118.3(3)
4	C5-C4-C7	121.7(3)	22	C3-C4-C7	120.0(3)
5	C6-C5-C4	120.7(3)	23	C5-C6-C1	119.6(3)
6	O2-C7-C8	107.3(2)	24	O2-C7-C4	110.7(2)
7	C8-C7-C4	110.1(2)	25	O2-C7-C16	103.8(2)
8	C8-C7-C16	113.3(2)	26	C4-C7-C16	111.3(2)
9	C9-C8-C7	122.9(3)	27	C8-C9-C10	123.7(3)
10	O1-C10-C11	122.7(3)	28	O1-C10-C9	121.2(3)
11	C11-C10-C9	116.0(3)	29	C12-C11-C10	120.5(3)
12	C12-C11-C16	120.3(3)	30	C10-C11-C16	119.2(3)
13	C11-C12-C13	121.7(3)	31	C14-C13-C12	120.4(3)
14	C13-C14-C15	120.8(3)	32	C14-C15-C17	113.9(3)
15	C14-C15-C16	113.4(3)	33	C17-C15-C16	102.1(3)
16	C11-C16-C7	113.3(2)	34	C11-C16-C15	111.4(2)
17	C7-C16-C15	101.1(2)	35	O2-C17-C15	107.3(3)
18	C17-O2-C7	109.0(2)			

2.6 Bibliografía

- ⁴⁴ M. Christmann, S. Bräse, *Asymmetric Synthesis II: More Methods and Applications*; Ed. Wiley-VCH Verlag & Co KGaA, **2012**, pág. 383.
- ⁴⁵ a) L. Pouységu, D. Deffieux, S. Quideau, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 2235; b) S.P. Roche, J.A. Porco, Jr., *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4154.
- ⁴⁶ Para artículos sobre desaromatización oxidativa de fenoles aplicada a la síntesis de productos naturales, véase: a) S. Kodama, Y. Hamashima, K. Nishide, M. Node, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2659; b) L. Liu, Y. Gao, C. Che, N. Wu, D. Z. Wang, C.C. Li, Z. Yang, *Chem. Commun.* **2009**, 662; c) J. Liang, J. Chen, J. Liu, L. Li, H. Zhang, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3666; d) J. Y. Cha, Y. Huang, T. R. R. Pettus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9519; e) J. Y. Cha, G. L. Burnett IV, Y. Huang, J. B. Davidson, T. R. R. Pettus, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 1361; f) J. C. Green, T. R. R. Pettus, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1603.
- ⁴⁷ D. Magdziak, S. J. Meek, T. R. R. Pettus, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1383.
- ⁴⁸ Q. Ding Y. Ye, R. Fan, *Synthesis* **2013**; *45*, 1.
- ⁴⁹ M. Breuning, E. J. Corey, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1559.
- ⁵⁰ R. Imbos, A. J. Minnard, B. L. Feringa, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 184.
- ⁵¹ a) Q. Liu, T. Rovis, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2552; b) Q. Liu, T. Rovis, *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11*, 598.
- ⁵² N.T. Vo, R. D. M. Pace, F. O'Hara, M. J. Gaunt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 404.
- ⁵³ R. Leon, A. Jawalekar, T. Redert, M. J. Gaunt, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1487.
- ⁵⁴ M. Q. Jia, S. L. You, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 6363.
- ⁵⁵ Q. Gu, Z. Q. Rong, C. Zheng, S. L. You, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4056.
- ⁵⁶ Q. Gu, S. L. You, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1519.
- ⁵⁷ Q. Gu, S. L. You, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5192.
- ⁵⁸ S. Takizawa, T. M. N. Nguyen, A. Grossmann, D. Enders, H. Sasai, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5423.
- ⁵⁹ R. Tello-Aburto, K. A. Kalstabakken, K. A. Volp, A. M. Harned, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7849.
- ⁶⁰ Véase p.ej.: (a) H. Ye, G. Deng, J. Liu, F.G. Qiu, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5442. (b) M. Leclaire, R. Levet, F. Péricaud, L. Ricard, J. Y. Lallemand, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 7703.
- ⁶¹ J. Germain, P. Deslongchamps, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5269.
- ⁶² Para artículos sobre azadirachtina, véase: J. Jauch, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 34 y referencias aquí citadas.
- ⁶³ S. Hanessian, N. Boyer, G. Jayapal, B. Deschenês-Simard, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4640.

⁶⁴ D. Shin, C. Liao, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4741.

⁶⁵ R.P. Hsung, K.P. Cole, L.R. Zehnder, J. Wang, L.L. Wei, X.F. Yang, H.A. Coverdale, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 311.

⁶⁶ Véase, p. ej.: a) J. Wang, K. P. Cole, L. Wei, L. R. Zehnder, R. P. Hsung, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 3337; b) H. Miyaoka, M. Yamanishi, Y. Kajiwarra, Y. Yamada, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 3476; c) K. P. Cole, R. P. Hsung, X. F. Yang, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 3341; d) K. C. Nicolaou, Y.H. Lim, J. Becker, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3444.

⁶⁷ Véase p. ej. la siguiente revisión: P. Shah, A. Westwell, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2007**, *22*, 527.

⁶⁸ Para una revisión sobre la importancia de los acetales, véase: a) J. E. Aho, P. M. Pihko, T. K. Rissa, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4406; para algunos ejemplos de acetales y N;O-aminales, véase: b) A. B. Smith III, I. G. Safanov, R. M. Corbett, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12426; c) D. M. Troast, J. A. Porco, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 991; d) J.-H. Sohn, N. Waizumi, M. Z. Zhong, V. H. Rawal, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7290; e) J. C. Jewett, V. H. Rawal, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6502; f) R. H. Cichewicz, F. A. Valcrite, P. Crews, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1951; g) D. Seebach, A. R. Sting, M. Hoffmann, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2881; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2708.

⁶⁹ Véase, p. ej.: a) H. Frauenrath, S. Reim, A. Wiesner, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 1103; b) A. H. Hoveyda, R. R. Schrock, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 945; c) S. D. Burke, N. Müller, C. M. Beaudry, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1827.

⁷⁰ Para aproximaciones enantioselectivas de síntesis de acetales enantioméricamente enriquecidos, véase: a) S. Vellalath, I. Coric, B. List, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9749; b) G. Li, F. R. Fronczek, J. C. Antilla, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12216.

⁷¹ H. V. Pham, R. S. Paton, A. G. Ross, S. J. Danishefsky, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2397.

⁷² a) H. Pingali y col., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 5586. b) X. Lu, R. B. Silverman, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10583.

⁷³ S. Stayber, M. Jereb, M. Zupan, *Synlett* **1999**, *9*, 1375.

Capítulo 3

Nuevos compuestos de platino con ligandos derivados 8-hidroxiquinolina: estabilidad, citotoxicidad e interacción con ADN

Los compuestos de platino constituyen en la actualidad fármacos de primera línea en el tratamiento de distintos tipos de cáncer. Sin embargo, sus principales desventajas, como son su toxicidad y la resistencia, han impulsado el desarrollo de nuevos complejos con estructuras no convencionales y nuevos mecanismos de acción. En este capítulo se presenta la síntesis una nueva serie de complejos de Pt(II) con ligandos derivados de 8-hidroxiquinolina, los cuales han mostrado una alta actividad citotóxica en distintas líneas tumorales.

3.1 Introducción

3.1.1 Los compuestos de platino en la quimioterapia del cáncer

Entre el elevado número de fármacos utilizados en clínica para el tratamiento de los distintos tipos de cáncer, los compuestos de platino representan un pequeño grupo formado por tan solo cinco compuestos (Figura 3.1), de los cuales únicamente tres (cisplatino, carboplatino y oxaliplatino) se encuentran aprobados a nivel mundial.

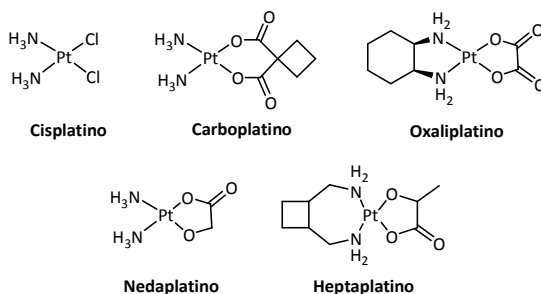


Figura 3.1

Cisplatino y otros compuestos de platino utilizados actualmente en clínica para el tratamiento de distintos tipos de cáncer.

Cuando Barnett Rosenberg descubrió la actividad antitumoral del complejo *cis*-diclorodiaminoplatino(II) (también conocido como cisplatino o CDDP) en el año 1965,⁷⁴ se utilizaban en el tratamiento del cáncer diversos compuestos de naturaleza orgánica, los cuales únicamente mostraban cierta eficacia en algunos tipos de tumores (principalmente hematológicos) y, además, causaban una elevada mielosupresión.⁷⁵ En este escenario, el gran éxito del cisplatino se debió a su elevada actividad frente a distintos tumores sólidos, principalmente en el cáncer testicular, uno de los tipos de cáncer más habituales en varones, frente al cual proporcionaba un alto porcentaje de curación, que pasó del 5 al 60%.⁷⁶ De esta forma, el cisplatino se convirtió en el primer fármaco antitumoral de platino utilizado en clínica, tras su aprobación por la FDA en el año 1978, para el tratamiento del cáncer testicular⁷⁷ en combinación con vinblastina y bleomicina y, junto con adriamicina y clorambucilo, en el caso de cáncer de ovario.⁷⁸

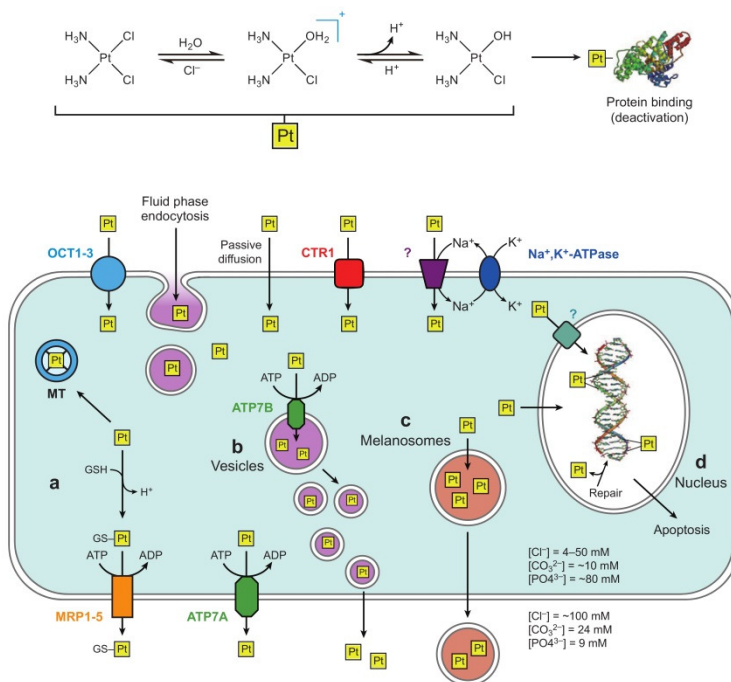
Debido a las ventajas terapéuticas que ofrecen los compuestos antitumorales de platino, en la actualidad constituyen fármacos de primera línea en la quimioterapia del cáncer, estimándose que hasta un 50-70% de los pacientes oncológicos son tratados con un fármaco de platino,⁷⁹ lo cual los convierte en los fármacos antineoplásicos más utilizados y,

por lo tanto, también en los más vendidos. Actualmente, el cisplatino está indicado para el tratamiento, en la terapia combinada con otros fármacos antineoplásicos, del cáncer testicular, de ovario, cabeza y cuello, vejiga y pulmón.

3.1.2 Mecanismo de acción de los compuestos de platino

Aunque ha transcurrido casi medio siglo desde su descubrimiento, el proceso mediante el cual el cisplatino ejerce su actividad antitumoral no está totalmente esclarecido. Sin embargo, datos experimentales han permitido establecer lo que se conoce como: *el mecanismo de acción del cisplatino* (Figura 3.2).

Debido a su baja solubilidad en agua (aprox. 1mg/mL), la biodisponibilidad oral del cisplatino es muy limitada, de manera que debe ser administrado por vía intravenosa directamente en el torrente sanguíneo, desde donde es distribuido a todas las células del organismo, en mayor o menor medida. Aunque tradicionalmente se ha asumido que el mecanismo principal mediante el cual el cisplatino es transportado al interior celular es la difusión pasiva,⁸⁰ existen evidencias de que otros mecanismos de transporte pueden producirse simultáneamente. Así, las proteínas transportadoras de cobre, Ctr1⁸¹ y Ctr2⁸², el transportador de cationes orgánicos, OCT1⁸³, o la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa,⁸⁴ parecen estar también implicados en la entrada del cisplatino al interior celular. Una vez en el citoplasma, la baja concentración de ión cloruro (4-20 mM frente a 100 mM en el espacio extracelular),⁸⁵ favorece su acuación, lo que da lugar a varias especies, de las cuales la más reactiva es la especie catiónica $[\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2]^+$.⁸⁶ Esta última especie es la que preferentemente atraviesa la membrana nuclear y reacciona con el ADN, principalmente por interacción con el N-7 de adenina y guanina,⁸⁷ formando inicialmente aductos monofuncionales que evolucionan posteriormente a bifuncionales⁸⁸ mediante la formación de una segunda unión con el ADN, normalmente intracatenaria.⁸⁹

**Figura 3.2**

Representación del “mecanismo de acción del cisplatino”. (Adaptado de la referencia 95).

Aunque se han descrito diversos tipos de aductos,⁹⁰ los aductos intracatenarios entre dos guaninas adyacentes 1,2-GpG, (los cuales constituyen un 60-65% del total de los aductos) son los que producen de una manera más eficaz el desenrollamiento de la molécula de ADN y su torsión hacia el surco mayor de la doble hélice.⁹¹ Esta distorsión es reconocida por diversas proteínas nucleares, las cuales disparan distintas rutas celulares de transducción de señales que conducen finalmente o bien al arresto celular, o bien a la muerte celular, principalmente mediante apoptosis, aunque ésta también puede producirse mediante necrosis, en menor medida.⁹²

3.1.3 Toxicidad y Resistencia

Cualquier efecto producido por los fármacos en el organismo es consecuencia de su interacción con un receptor farmacológico y, por lo tanto, cuanto menor es su selectividad, mayor es el número de efectos adversos que produce. Los compuestos de platino ejercen su acción farmacológica a través de su unión al ADN, una molécula presente en todas las células del organismo y, por lo tanto, carecen de selectividad hacia las células

tumorales. Además, debido a sus propiedades químicas, son susceptibles de reaccionar con distintas especies nucleófilas, especialmente si éstas presentan átomos dadores blandos, principalmente átomos de azufre, como es el caso del tripéptido glutatión y de numerosas proteínas.⁹³ En consecuencia, los efectos tóxicos del cisplatino son muy diversos y entre ellos se han descrito: gastrotoxicidad, ototoxicidad, neurotoxicidad, mielosupresión y reacciones alérgicas. Sin embargo, el principal efecto tóxico y limitante de la dosis es la nefrotoxicidad, lo cual está relacionado con el hecho de que el cisplatino es rápidamente eliminado del organismo por vía renal.⁹⁴

Otro importante inconveniente derivado del uso de los compuestos antitumorales de platino comercializados es el fenómeno de resistencia, el cual es un problema común en la quimioterapia del cáncer, y el cisplatino no es una excepción, considerándose una de sus principales desventajas. Algunos de los tumores más comunes, como por ejemplo: cáncer de próstata, mama o colorrectal, presentan una insensibilidad intrínseca al cisplatino, mientras que otros tipos de cáncer, por ejemplo cáncer de ovario, adquieren resistencia tras varios tratamientos. Los mecanismos que ocasionan la resistencia al cisplatino pueden clasificarse en dos grupos según el momento en que se producen, antes o después de su interacción con el ADN.

Los mecanismos de resistencia que se producen antes de la interacción con el ADN afectan a la acumulación intracelular de cisplatino, la cual parece depender principalmente de tres factores.⁹⁵ En primer lugar, su fuerte unión a las proteínas plasmáticas⁹⁶ (hasta en un 90%) y la interacción con otras especies nucleófilas del plasma sanguíneo, reducen significativamente la fracción de fármaco libre tras su administración intravenosa. En segundo lugar, la desregulación de la síntesis y traslocación de diversas proteínas de membrana implicadas en la incorporación del cisplatino al interior celular, limita su entrada únicamente a través de difusión pasiva. Por último, la activación de diversos mecanismos de detoxificación celular como la conjugación con glutatión, así como la sobreexpresión de proteínas dependientes de ATP implicadas en el fenómeno de multirresistencia a los fármacos (MDR), reducen la ya de por sí limitada concentración citoplasmática del fármaco, de manera que tan solo el 1% del cisplatino que entra en la célula consigue alcanzar el ADN nuclear.⁹⁷

Los mecanismos de resistencia que se producen después de la interacción con el ADN, responden al reconocimiento de los aductos, por diferentes proteínas que promueven la supervivencia celular a través de la reparación del ADN o del aumento de la tolerancia al daño producido en el material genético. El principal mecanismo de reparación del ADN es la reparación por excisión de nucleótidos (NER), mediante el cual los

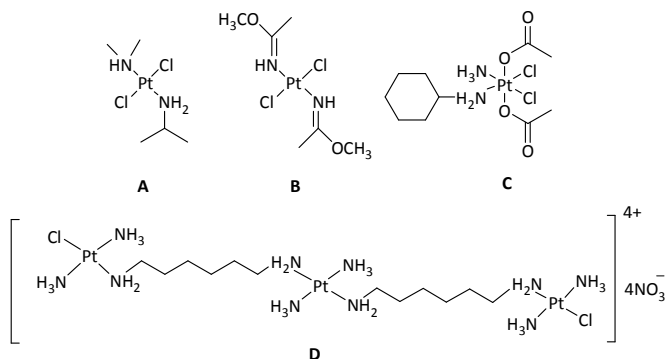
nucleótidos que contienen los aductos son eliminados. Por otra parte, el mecanismo mismatch repair (MMR) induce la apoptosis tras el reconocimiento de los aductos por las proteínas MSH2, MSH3 y MSH6, por lo que la reducción de este mecanismo aumenta la tolerancia al tratamiento. Así, la hipersensibilidad del cáncer testicular al cisplatino parece estar relacionada con deficiencias en el mecanismo NER, mientras que una actividad incrementada de este mecanismo unido a la pérdida del mecanismo MMR parecen estar implicados en la resistencia adquirida, característica del cáncer de ovario. Además, diversas polimerasas “bypass” (polimerasas β y η) son capaces de llevar a cabo la replicación del ADN dañado evitando la replicación de las zonas lesionadas. Finalmente, la tolerancia también puede producirse como consecuencia de la alteración en el funcionamiento de diversas rutas de señalización proapoptóticas, como p53, AKT o MAPK/JNK/ERK. Así, por ejemplo, la proteína p53 es una importante proteína supresora de tumores que se encuentra mutada en el 50% de los tumores humanos, los cuales muestran por lo tanto resistencia intrínseca al tratamiento con cisplatino.

3.1.4 Compuestos no convencionales de platino

El éxito obtenido por el cisplatino provocó que en los años posteriores a su descubrimiento se produjera un gran desarrollo de la Química Bioinorgánica, debido a los numerosos estudios realizados en este campo de la química en la búsqueda de otros compuestos de platino con actividad antitumoral, así como en la elucidación de su mecanismo de acción. Pero, para que un nuevo fármaco sea aprobado, debe presentar alguna ventaja sustancial con respecto a los fármacos ya comercializados para la misma indicación. Por lo tanto, las principales desventajas del cisplatino, como son su toxicidad, la resistencia y los inconvenientes asociados a su administración intravenosa, han dirigido la investigación hacia la obtención de compuestos con un mayor índice terapéutico, un mayor espectro de actividad y una mayor biodisponibilidad oral. Aunque inicialmente la investigación estuvo centrada en la síntesis y evaluación de complejos estructuralmente relacionados con el cisplatino, más tarde, la elevada actividad (superior a la del cisplatino, incluso en células resistentes) mostrada por distintos compuestos con estructuras diferentes, incapaces de formar el mismo tipo de aductos con el ADN, dirigió la investigación hacia la búsqueda de complejos con “estructuras no convencionales” y nuevos mecanismos de acción. En este contexto, se han desarrollado distintos tipos de complejos, entre los que cabe destacar los complejos con geometría *trans*, complejos de Pt(IV) y complejos catiónicos polinucleares (Figura 3.3).

Debido a su elevada reactividad, el isómero *trans* del cisplatino, *trans*-[PtCl₂(NH₃)₂], sufre una rápida acuación y reacciona rápidamente con especies nucleófilas, por lo que resulta biológicamente inactivo. Sin embargo, la sustitución de los ligandos amino por otros ligandos estéricamente más impedidos, reduce su reactividad, evitando su inactivación antes de su unión al ADN, y formando, preferente y contrariamente al cisplatino, aductos monofuncionales intercatenarios^{98a,b} preferentemente. En este campo, nuestro grupo de investigación posee una amplia experiencia,^{99a-e} y en él se han desarrollado por ejemplo, distintos complejos *trans* de Pt(II) con distintas aminas alifáticas (**A**, Figura 3.3), los cuales han mostrado una actividad superior a la del cisplatino en líneas celulares sensibles y resistentes. Los complejos *trans* con ligandos iminoéter (**B**, Figura 3.3), descritos por el grupo de Natile,¹⁰⁰ constituyen otro ejemplo de compuestos *trans* de platino con actividad antitumoral.

Rosenberg observó que los compuestos de Pt(IV) resultaban menos activos que sus análogos de Pt(II), aunque más estables, y en consecuencia, estos últimos han acaparado la atención en el desarrollo de nuevos compuestos antitumorales de platino. Sin embargo, la mayor estabilidad de los complejos de Pt(IV) ha hecho que el interés por los complejos de Pt(IV) resurgiera posteriormente debido a la búsqueda de complejos con una menor toxicidad y una mayor biodisponibilidad oral. Su conocida escasa reactividad frente a las reacciones de sustitución, en comparación con complejos de Pt(II), les confiere una menor toxicidad y, por otra parte, la posibilidad de incorporar ligandos axiales con distinto carácter hidrofílico/lipofílico, permite modular su solubilidad para obtener una adecuada absorción oral. Los complejos de Pt(IV) constituyen un perfecto ejemplo de profármacos.¹⁰¹ Su elevada estabilidad les permite ser distribuidos inalterados hasta su lugar de acción, el citoplasma celular, donde son transformados en la especie activa de Pt(II), mediante un proceso de reducción, en el cual se liberan los ligandos axiales. El grado de reducción está directamente relacionado con las características electrónicas y el volumen estérico tanto de los ligandos axiales como ecuatoriales, y por lo tanto, la variación de éstos permite modular este proceso. En este campo, Kelland ha descrito diversos complejos activos de Pt(IV).¹⁰² Entre ellos, el compuesto JM216, conocido como satraplatino (**C**, Figura 3.3), el cual carece de resistencia cruzada con cisplatino, representa el primer complejo desarrollado para su administración oral. Sin embargo, debido a la disminución de su lipofilia tras la reducción y liberación de los ligandos axiales, el compuesto mostró una elevada variabilidad en su absorción durante los ensayos clínicos,¹⁰³ y fue abandonado en fase III.


Figura 3.3

Distintos compuestos de platino con estructuras no convencionales.

Dentro del desarrollo de complejos con estructuras no convencionales, Farrell describió complejos catiónicos polinucleares de Pt(II) con hasta cuatro cargas positivas que se encuentran entre los complejos de platino más activos descritos.¹⁰⁴ De todos ellos, el compuesto trinuclear BBR3464 (**D**, Figura 3.3), el cual se encuentra actualmente en ensayos clínicos de fase II, muestra una muy alta actividad citotóxica y carece de resistencia cruzada con cisplatino. La ventaja de estas especies catiónicas es su gran afinidad por la molécula polianiónica del ADN, con la cual interaccionan mucho más rápidamente que las especies neutras. En estos compuestos, las uniones entre los centros metálicos a través de alquildiaminas alifáticas, permite que los aductos se extiendan a lo largo de varias bases nitrogenadas de la cadena de ADN. Sin embargo, su carga supone un inconveniente a la hora de atravesar la membrana celular mediante difusión pasiva.

En la actualidad las estrategias de “target and delivery”, las cuales constituyen un área de gran desarrollo, son aplicadas también a los compuestos de Pt(IV).¹⁰⁵ Así, la coordinación al centro metálico de “drug targets” como por ejemplo antígenos tumorales permite su envío selectivo a las células tumorales, mientras que su encapsulación en nanopartículas funcionalizadas con péptidos, anticuerpos o aptámeros permite además su liberación controlada en el lugar de acción.¹⁰⁶

3.1.5 Compuestos de platino con ligandos *N*-heteroaromáticos

Tras casi cincuenta años de investigación, el establecimiento de los requerimientos estructurales para la actividad antitumoral de los compuestos de platino constituye una difícil tarea, ya que se han sintetizado miles de compuestos con estructuras químicas muy diversas, algunos de los cuales se encuentran actualmente en fases

avanzadas de ensayos clínicos. Sin embargo, la realidad es que aparte del cisplatino, solo dos compuestos más, carboplatino y oxaliplatino, han alcanzado su uso clínico y, por lo tanto, hoy en día la búsqueda de nuevos complejos de platino con estructura no convencional y nuevos mecanismos de acción, continúa constituyendo un área prioritaria de investigación en la lucha contra el cáncer. En este contexto, la sustitución de los ligandos amino o amina, por ligandos aromáticos *N*-dadores, ha demostrado ser una estrategia muy efectiva para la obtención de compuestos activos con propiedades interesantes. Por una parte, la utilización de ligandos *N*-heteropoliaromáticos ha sido explotada en la búsqueda de complejos con diferentes mecanismos de acción, dentro del campo de los intercalantes. En esta área, diferentes complejos con terpiridina¹⁰⁷ (**A**, Figura 3.4), 1,10-fenantrolina^{108a-e} (**B**, Figura 3.4) y otros ligandos policíclicos de nitrógeno,¹⁰⁹ han sido extensamente estudiados. Por otra parte, la incorporación de este tipo de ligandos permite la obtención de complejos estéricamente impedidos, los cuales resultan, por lo tanto, menos reactivos. Así por ejemplo, el complejo ZD0473 o picoplatino (**C**, Figura 3.4), ha sido diseñado para evitar el fenómeno de resistencia como consecuencia, según los autores, del impedimento estérico hacia el ataque por diferentes especies nucleófilas, proporcionado por la presencia de un ligando 2-metilpiridina. Además, la incorporación de este ligando aporta al complejo la lipofilia necesaria para posibilitar su administración oral. Del mismo modo, Farrel y col. han descrito complejos *trans* en los que la incorporación de distintos ligandos aromáticos, como piridina, tiazol y quinolina (**D**, **E** y **F**, Figura 3.4), introduce en los complejos el impedimento estérico necesario para rebajar su reactividad, ya que los complejos resultantes son menos sensibles a los fenómenos de hidrólisis y acuación, y en consecuencia son más estables.

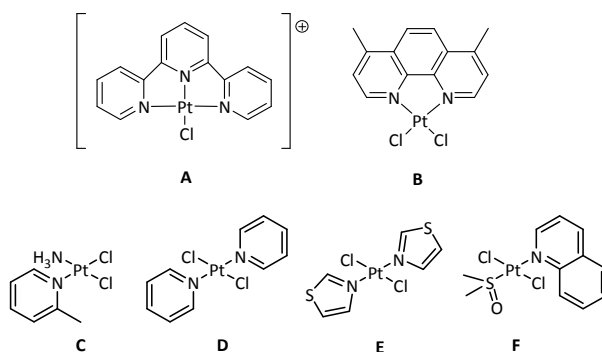


Figura 3.4

Compuestos de platino con ligandos *N*-heteroaromáticos.

Aparte de los compuestos *trans* descritos por Farrell, no existen en la bibliografía ejemplos de complejos de platino con otros ligandos derivados de quinolina. Sin embargo, las 8-hidroxiquinolinas constituyen estructuras privilegiadas en química médica, debido a su capacidad para interaccionar con múltiples receptores, por lo cual han sido utilizadas en el desarrollo de fármacos contra enfermedades muy diversas,¹¹⁰ como: el cáncer,^{111a-i} la tuberculosis,¹¹² la esclerosis múltiple¹¹³ o enfermedades hematológicas,¹¹⁴ entre otras.^a Incluso, se han descrito complejos formados por estos ligandos con distintos metales, con distintas actividades biológicas, como antimicrobiana¹¹⁵ y antiviral.¹¹⁶ Interesantemente, gran parte de sus propiedades biológicas son consecuencia de su capacidad para formar quelatos con distintos iones metálicos, y su actividad se produce a través de diferentes mecanismos de acción.¹¹⁷ Concretamente, el clioquinol (5-Cl-7-I-8-hidroxiquinolina) es capaz de formar quelatos con los iones Cu^{2+} y Zn^{2+} , inhibiendo así la agregación del péptido β -amiloide ($\text{A}\beta$) (Figura 3.5). Diferentes ensayos clínicos^{118a,b} han revelado que este fármaco (denominado PBT-1), originalmente utilizado como antiséptico tópico, y más tarde como un efectivo amebicida en el tratamiento la disentería y la diarrea, (el cual fue retirado del mercado durante los años 60 bajo sospecha de producir neuropatía mieloóptica subaguda (SMON)¹¹⁹) ralentiza el deterioro cognitivo en pacientes con Alzheimer moderado a severo.

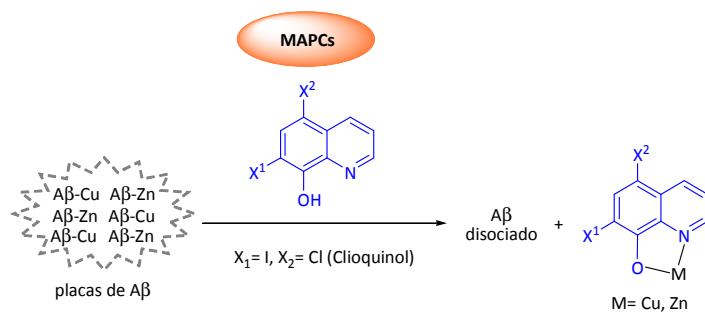


Figura 3.5

Actividad neuroprotectora de los MPACs, representados por análogos de clioquinol (PBT-1). Su capacidad para formar quelatos con Cu^{2+} y Zn^{2+} inhibe la agregación del péptido $\text{A}\beta$ y favorece la disolución de los agregados ya formados.

El clioquinol constituye la primera generación de un grupo de fármacos conocido como MPACs (Metal-Protein Attenuating Compounds). Estos compuestos se comportan como agentes quelantes débiles, pudiendo formar quelatos con distintos iones metálicos de manera reversible. Además, su elevada lipofilia les permite atravesar fácilmente las

^a Una búsqueda en SciFinder muestra cientos de publicaciones en relación con las 8-hdroxiquinolinas y sus propiedades biológicas.

membranas biológicas mediante difusión pasiva. De esta forma, los MPACs actúan como agentes ionóforos, restableciendo los niveles normales de iones metálicos en los distintos compartimentos celulares.¹²⁰ Sin embargo, a pesar de sus propiedades quelantes y de su actividad frente a otras enfermedades, la actividad antitumoral de compuestos de platino con este tipo de ligandos, nunca ha sido evaluada.^b

^b Únicamente existen dos publicaciones acerca de la síntesis y caracterización estructural de complejos de platino con este tipo de ligandos: a) P. Vranec, I. Potočňak, V. Kavečansky, *Polyhedron*, **2012**, 39, 118. (donde se describe un complejo de Pt(II) con dos ligandos clioquinol); b) M. Kato, Y. Ogawa, M. Kozakaib, Y. Sugimoto, *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.*, **2002**, 58, m147 (donde se describe un complejo de Pt(II) con dos ligandos 8-hidroxiquinolina).

3.2 Objetivos

La estructura privilegiada de las 8-hidroxiquinolinas permite a este grupo de compuestos presentar actividad frente a enfermedades muy diversas y, en muchos casos, esta actividad se produce como consecuencia de su capacidad para formar quelatos con iones metálicos. Sin embargo, la actividad antitumoral de complejos de platino con este tipo de ligandos no ha sido previamente estudiada.

En consecuencia, en este capítulo se plantea la síntesis y evaluación de la actividad antitumoral de una nueva serie de compuestos de Pt(II) con ligandos derivados de 8-hidroxiquinolina (Figura 3.6). Asimismo se llevará a cabo el estudio del efecto que ejerce en sus propiedades biológicas tanto la sustitución por átomos de halógeno en el anillo aromático del ligando, como el modo de coordinación de éste al metal. Además se evaluarán ciertas propiedades farmacocinéticas de interés en el desarrollo de nuevos fármacos de platino.

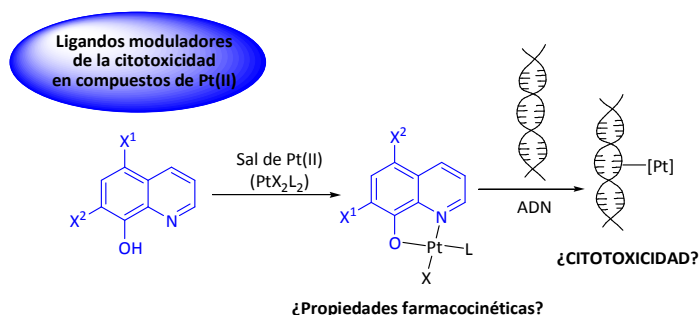


Figura 3.6

Posible actividad antitumoral de compuestos de platino con ligandos derivados de 8-hidroxiquinolina.

Por lo tanto, los objetivos del presente capítulo son los siguientes:

- 1) Optimización de las condiciones de reacción para la síntesis de los nuevos complejos de Pt(II).
- 2) Síntesis de una serie de complejos de Pt(II) con ligandos derivados de 8-hidroxiquinolina diferentemente sustituidos por átomos de halógeno, así como la síntesis de un complejo con un ligando derivado de quinolina.

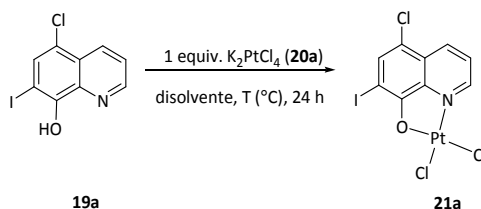
- 3) Evaluación biológica de la actividad antitumoral de los complejos y estudio del efecto que ejercen en dicha actividad factores como: la variación de la sustitución en el ligando y el modo de coordinación de éste.
- 4) Estudio de su interacción con el ADN mediante electroforesis.
- 5) Determinación de propiedades farmacocinéticas de interés, como la estabilidad, la solubilidad y la lipofilia, de algunos de los complejos sintetizados.

3.3 Resultados y Discusión

3.3.1. Síntesis de los complejos

Para llevar a cabo la síntesis de los complejos de platino diseñados se procedió, en primer lugar, a la optimización de la reacción entre el clioquinol (**19a**) y la sal K_2PtCl_4 (**20a**), que es la fuente de platino utilizada habitualmente para la obtención de complejos de Pt(II) (Tabla 3.1). Sin embargo, aun empleando distintas condiciones de reacción, no fue posible obtener el complejo deseado. Tanto la utilización de uno o dos equivalentes del ligando **19a** (entradas 1 y 2, Tabla 3.1), como la presencia de una base (NaOH) la cual podría desprotonar la posición de naturaleza fenólica del ligando, aumentando así su nucleofilia, (entradas 3, 4), no produjo ningún tipo de reacción, obteniéndose únicamente a los materiales de partida inalterados.

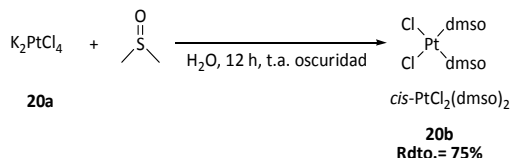
Tabla 3.1
Optimización de la reacción entre el clioquinol y K_2PtCl_4 .^a



Entrada	Disolvente	Condiciones	Rdto. (%)
1	MeOH	1 equiv. 19a	Material de partida
2	MeOH	2 equiv. 19a	Material de partida
3	MeOH	1 equiv. 19a , 1 equiv. NaOH	Material de partida
4	MeOH	2 equiv. 19a , 1 equiv. NaOH	Material de partida

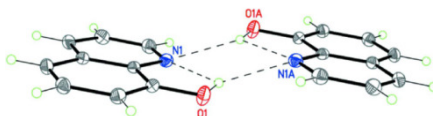
^aTodas las reacciones se llevaron a cabo a una escala de reacción 0.17 mmol de **19a** en 0.45 mL del disolvente indicado en cada caso, a 24 h. y a t.a.

A la vista de estos resultados se decidió utilizar como fuente de Pt(II) el complejo *cis*-PtCl₂(dmsO)₂ (**20b**), que ha sido utilizado previamente en el grupo para la síntesis de complejos de platino *trans* con ligandos sulfonamida.¹²¹ Para ello se procedió a sintetizar dicho complejo siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía¹²² (Esquema 3.1), obteniéndose **20b** en buen rendimiento.

**Esquema 3.1**

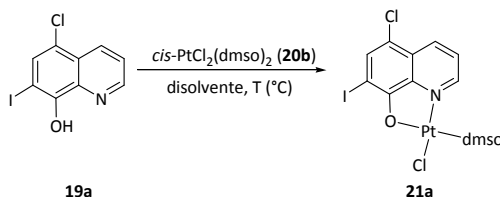
Síntesis del complejo *cis*-[PtCl₂(dmsO)₂] (**20a**).

A continuación se llevó a cabo la optimización de la reacción entre el clioquinol (**19a**) y el complejo *cis*-PtCl₂(dmsO)₂ (**20b**). En primer lugar se trató el complejo **20b** con uno o dos equivalentes de clioquinol **19a**, utilizando metanol como disolvente, dando lugar en ambos casos a mezclas complejas de reacción (entradas 1 y 2, Tabla 3.2). Posteriormente, con objeto de mejorar la solubilidad del complejo **20b** se utilizó acetona como disolvente, obteniéndose de nuevo en ambos casos, resultados infructuosos (entradas 3 y 4). La falta de reactividad de este tipo de ligandos en el medio de reacción podría deberse a la reducción de su nucleofilia como consecuencia de la formación de un enlace de hidrógeno bifurcado entre el OH de una molécula y el átomo de nitrógeno de naturaleza piridinica de la misma molécula y, a su vez, con el de una molécula vecina, tal y como ha sido demostrado mediante difracción de rayos X¹²³ (Figura 3.7). Por tanto, para romper estos enlaces de hidrógeno decidimos llevar a cabo la reacción en condiciones básicas, mediante la utilización de NaOH (entradas 6-10).

**Figura 3.7**

Enlaces de hidrógeno bifurcados entre dos moléculas de 8-hidroxiquinolina, dando lugar a dímeros centrosimétricos. Adaptado de la referencia 123a.

En primer lugar se procedió a llevar a cabo la reacción con 1.0 equivalente de base y 1.0 equivalente del ligando **19a**, dando lugar al complejo **21a** con buen rendimiento, el cual fue fácilmente aislado tras filtración y lavado con H₂O y éter dietílico (entrada 6). El aumento en el número de equivalentes de base y ligando no provocó un aumento en el rendimiento (entradas 7 y 8), mientras que la utilización de un ligero aumento en los equivalentes de reacción aumentó ligeramente el rendimiento (comparar entradas 6 y 9). Finalmente se decidió llevar a cabo la reacción en otro disolvente, empleando una mezcla H₂O/acetona 1:2, dando lugar también al producto de deseado en buen rendimiento (entrada 10).

Tabla 3.2Optimización de la reacción para la síntesis del complejo **21a**.^a

Entrada	Disolvente	Condiciones	Rdto. (%)
1	MeOH	1 equiv. 19a	M. compleja
2	MeOH	2 equiv. 19a ^b	M. compleja
3	Acetona	1 equiv. 19a	M. compleja
4	Acetona	1 equiv. 19a ^b	M. compleja
6	MeOH/Acetona 1:2	1 equiv. 19a + 1 equiv. NaOH	(21a) 84
7	MeOH/Acetona 1:2	1.2 equiv. 19a + 1.2 equiv. NaOH	(21a) 80
8	MeOH/Acetona 1:2	2.2 equiv. 19a + 2 equiv. NaOH	(21a) 79
9	MeOH/Acetona 1:2	1.05 equiv. 19a + 1.2 equiv. NaOH	(21a) 86
10	H ₂ O/Acetona 1:2	1 equiv. 19a + 1.05 equiv. NaOH	(21a) 81

^a Todas las reacciones se llevaron a cabo a una escala de reacción de 0.17 mmol del compuesto **19a** y los equivalentes indicados, en 0.45 mL del disolvente indicado en cada caso, a un tiempo de 24 h y a t.a. ^b Estas reacciones fueron llevadas a cabo a 40°C. M. compleja = Mezcla compleja.

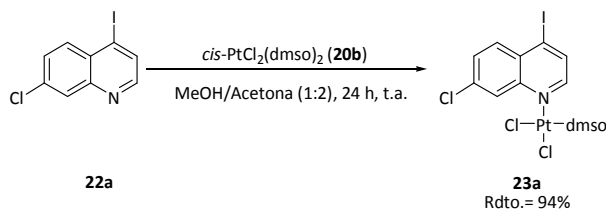
Obtenidas las condiciones óptimas de reacción (entrada 9, Tabla 3.2), se procedió a la síntesis de nuevos complejos **21b-d**, (entradas 2 y 3, Tabla 3.3) a partir de diferentes ligandos derivados de quinolina comerciales. Los complejos **21a** y **21b** presentan diferentes átomos de halógenos en las posiciones X¹ y X² del ligando (entradas 1 y 2). Adicionalmente, se sintetizaron dos complejos más, uno que no presenta sustitución en la posición X², **21c** (entrada 3, Tabla 3.3), y otro que no tiene sustituyentes en ninguna de las dos posiciones, **21d** (entrada 4, Tabla 3.3), con el objetivo de comparar la influencia de los efectos estéricos y electrónicos en las propiedades biológicas.

Tabla 3.3Alcance de la reacción frente a derivados de hidroxiquinolina.^a

Entrada	Ligando	X ¹	X ²	Rdto. (%) - compuesto
1	19a	Cl	I	86- 21a
2	19b	Cl	Cl	77- 21b
3	19c	Cl	H	77- 21c
4	19d	H	H	78- 21d

^a Todas las reacciones se llevaron a cabo a una escala de reacción 1 mM de los compuestos **19a-d** durante 24h. y a t.a.

Por último, para poder estudiar el efecto de la quelación del complejo en la actividad biológica de estos compuestos, se sintetizó además otro complejo (compuesto **23**) a partir del ligando 7-cloro-4-yodoquinolina (**22a**), el cual carece de sustituyente hidroxilo en la posición 8. Su síntesis se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento que en el caso de los compuestos **21a-d**, pero en este caso, en ausencia de base (Esquema 3.2). Todo los complejos, **21a-d** y **23**, fueron obtenidos con un elevado rendimiento (77-94%).

**Esquema 3.2**Síntesis del complejo **23**.

3.3.2 Asignación estructural del compuesto **21a**

Con el objeto de confirmar la estructura de los compuestos **21**, el compuesto **21a** fue cristalizado y fue posible obtener monocristales adecuados para su análisis mediante difracción de rayos X. Dicho análisis fue llevado a cabo por la Dra. M. I. López Solera, de la

Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Castilla La Mancha. En la figura 3.8 se muestra el ORTEP de la molécula **21a**.

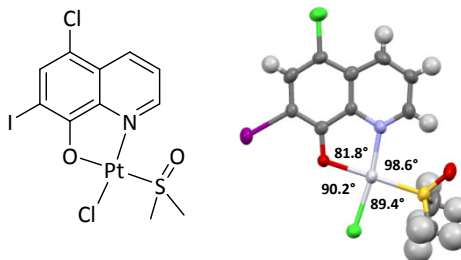


Figura 3.8

Compuesto **21d** (izqda.) y su ORTEP (dcha.) mostrando los ángulos de enlace en torno al centro metálico.

El estudio de difracción de rayos X muestra que existen dos moléculas por celdilla (véase Tabla 3.4). En la Tabla 3.5 se recogen algunas longitudes de enlace y ángulos seleccionados para una de ellas.^c El complejo presenta una geometría cuadrada plana distorsionada, en la cual el ángulo formado por los átomos de oxígeno y nitrógeno, sobre el átomo de platino, dista bastante de 90° (81.8°). Sin embargo, el ángulo N(1)-Pt(1)-S(1) es mucho mayor, con un valor de 98.58°. Adicionalmente, puede apreciarse una marcada influencia *trans* ejercida por el ligando 5-Cl-7-I-8-hidroxiquinolinato, que se refleja en la larga distancia de los enlaces Pt(1)-S(1) (2.1916 Å) y Pt(1)-Cl(1) (2.3024 Å).

Tabla 3.4

Datos cristalográficos del compuesto **21d**.

Fórmula empírica	C ₂₂ H ₂₀ Cl ₄ I ₂ N ₂ O ₄ Pt ₂ S ₂	Volumen (Å³)	3003.6(3)
Peso molecular	1226.30	Densidad calculada (mg/cm³)	2.712
Longitud de onda	0.71073	Coefficiente de absorción	11.888 (mm ⁻¹)
Sistema cristalino	Monoclínico	F(000)	2240
Grupo espacial	P 21/c	Reflexiones recogidas	20653
Z	8	Reflexiones observadas	4837
Parámetros celdilla	a (Å) 7.234(1) b (Å) 20.564(1) c (Å) 20.220(1) α (°) 90 β (°) 92.9861(1) γ (°) 90	Transmisión max. y min	0.891 y -1.112
		Índices R finales [I > 2 σ (I)]	
		R1	0.0283
		wR2	0.0595
		Bondad del ajuste, S	1.017

^c Los datos cristalográficos correspondientes al compuesto **21d** han sido depositados en la base de datos CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre) con el número: 883224.

Tabla 3.5Longitudes (Å) y ángulos de enlace (°) significativos del compuesto **21d**.

Entrada	Átomos	Longitud de enlace (Å)	Ángulo de enlace (°)
1	Pt(1)-N(1)	2.022(4)	-
2	Pt(1)-O(1)	2.029(4)	-
3	Pt(1)-S(1)	2.1916(15)	-
4	Pt(1)-Cl(1)	2.3024(15)	-
5	N(1)-Pt(1)-O(1)	-	81.81(16)
6	N(1)-Pt(1)-S(1)	-	98.58(13)
7	O(1)-Pt(1)-S(1)	-	176.98(12)
8	N(1)-Pt(1)-Cl(1)	-	172.05(13)
9	O(1)-Pt(1)-Cl(1)	-	90.25(10)
10	S(1)-Pt(1)-Cl(1)	-	89.37(6)

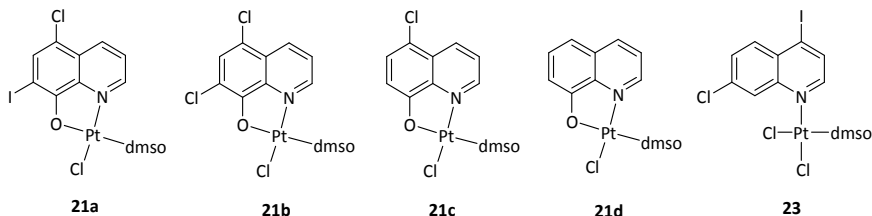
3.3.3 Evaluación de la actividad antitumoral

La actividad antitumoral de los compuestos **21a-d** y **23**, se ha evaluado frente a un panel de cuatro líneas tumorales representativas de los tipos de cáncer más habituales: **HBL-100** (carcinoma de mama), **HeLa** (adenocarcinoma de cérvix), **SW1573** (carcinoma alveolar de pulmón) y **WiDr** (adenocarcinoma colorrectal). El estudio de la citotoxicidad fue realizado por el grupo del Doctor J. M. Padrón, de la Universidad de La Laguna (Tenerife, España).

Los resultados se presentan como valores de GI_{50} (μM) obtenidos tras 48 h de tratamiento, y han sido determinados mediante el ensayo SRB. Los valores experimentales obtenidos se muestran en la Tabla 3.6, donde también se incluyen los datos para el cisplatino (CDDP), en las mismas líneas tumorales.

Tabla 3.6

Actividad antiproliferativa (GI_{50} , μM) de los compuestos **21a-d**, **23** y CDDP, en líneas celulares representativas de distintos tumores humanos sólidos.^a



Entrada	Complejo	HBL-100	HeLa	SW1573	WiDr
1	21a	1.9 (± 0.4)	14.0 (± 2.7)	1.9 (± 0.3)	14.0 (± 8.0)
2	21b	21 (± 0.75)	2.7 (± 0.045)	7.3 (± 0.76)	28 (± 5.4)
3	21c	6.6 (± 2.8)	2.1 (± 0.37)	3.6 (± 0.47)	15 (± 0.23)
4	21d	4.4 (± 0.23)	1.8 (± 0.29)	3.3 (± 0.55)	6.0 (± 1.9)
5	23	27 (± 0.78)	20 (± 1.3)	54 (± 3.6)	53 (± 2.7)
6	CDDP	1.9 (± 0.16)	2.0 (± 0.32)	3.0 (± 0.37)	26 (± 5.3)

^a Los datos se han recogido tras 48 horas de exposición a los compuestos. Los valores se dan en μM (entre paréntesis se indica la desviación estándar para 3-5 experimentos).

Los compuestos **21a-d**, en los cuales el ligando se coordina al metal de forma bidentada a través de un átomo de nitrógeno y un átomo de oxígeno, formando un quelato, muestran diferentes grados de actividad en función de la línea tumoral. Por ejemplo, el complejo **21a** resulta el más activo en las líneas HBL-100 y SW1573, mostrando una reducida actividad en las líneas HeLa y WiDr, en las cuales el compuesto **21d** es mucho más activo (véase Figura 3.9). Estos complejos difieren entre sí en la sustitución en la posición 7 del ligando 8-hidroxiquinolinato (sustituyente X^2), que varía entre I, Cl e H para **21a**, **21b** y **21c**, respectivamente, mientras que en el compuesto **21d**, $X^1 = X^2 = H$. Los resultados obtenidos muestran que la sustitución en el ligando tiene un importante efecto en la actividad antiproliferativa de los complejos, ya que, sorprendentemente, el cambio de un yodo por un cloro o por un hidrógeno, modifica la selectividad de estos compuestos con respecto a la línea tumoral.

En las líneas HBL-100, SW1573 y WiDr (Figura 3.8) el orden de citotoxicidad para los complejos **21a-d** fue el mismo: **21a**>**21d**>**21c**>>**21b**. Los compuestos **21a** y **21c-d** ($X^2 = I$ e H, respectivamente) mostraron una elevada actividad en las líneas HBL-100 y SW1573 ($GI_{50} = 1.9$ - $6.6 \mu M$), mientras que la presencia de un átomo de Cl en esta posición (compuesto **21b**) produjo una disminución de la citotoxicidad, especialmente acusada en la línea HBL-100 ($GI_{50} = 21 \mu M$). En contraste, en la línea HeLa, el compuesto **21a** ($X^2 = I$)

presenta una actividad aproximadamente 7 veces menor ($GI_{50} = 14 \mu M$), mientras que el compuesto **21b**, donde $X^2 = Cl$, es ahora mucho más activo ($2.7 \mu M$). Cabe destacar que el compuesto **21d**, que carece de sustituyentes sobre el ligando ($X^1 = X^2 = H$) mostró una elevada actividad frente a todas las líneas celulares ($GI_{50} = 1.8-6.0 \mu M$), en especial frente a la línea Hela, presentando una actividad unas cuatro veces mayor que el cisplatino en la línea WiDr (Figura 3.9). Interesantemente, esta línea está mutada en p53, por lo que en general resulta más resistente al tratamiento con diferentes fármacos antitumorales (como por ejemplo, el cisplatino), siendo por tanto este resultado muy destacable.

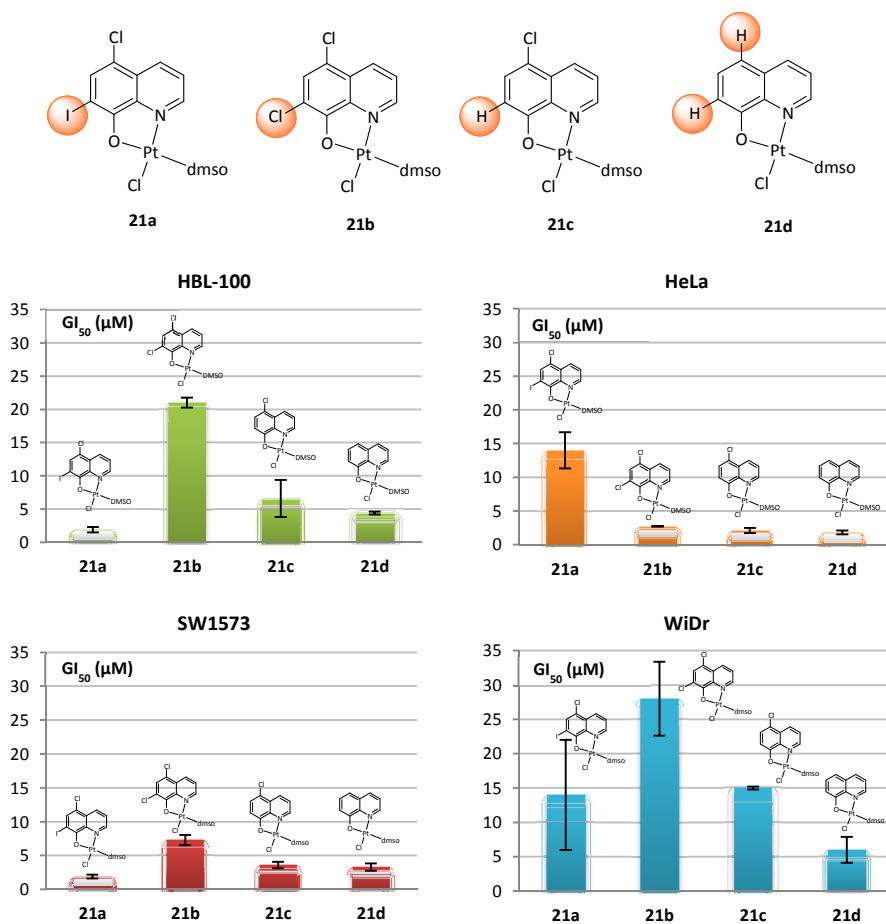


Figura 3.9

Gráficas donde se muestra la influencia de la sustitución por átomos de halógeno sobre el ligando 8-hidroxiquinolinato derivado, en función de cada tipo celular.

Por último, el efecto más notable en la actividad antiproliferativa de esta nueva serie de compuestos fue producido por la modificación del modo de coordinación del ligando (Figura 3.10). La sustitución del ligando bidentado 8-hidroxiquinolinato por un ligando monodentado derivado de quinolina, en el compuesto **23**, produjo una importante disminución de la actividad en todas las líneas celulares ($GI_{50} = 20-54 \mu M$), con respecto a los complejos quelados, indicando que la planaridad de la molécula forzada por la formación del quelato podría ser un requerimiento estructural imprescindible para la actividad de estos compuestos.

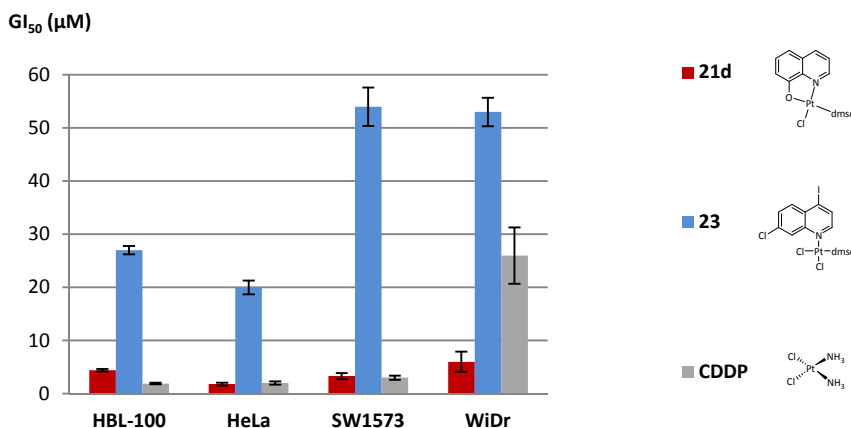


Figura 3.10

Comparación de la actividad antiproliferativa del compuesto más activo, **21d**, el menos activo, **23** y el cisplatino, **CDDP**.

3.3.4 Estudio de propiedades farmacocinéticas

Desde que los compuestos de platino fueron introducidos en la quimioterapia del cáncer han sido sintetizados numerosos complejos, los cuales, a pesar de presentar una elevada potencia, no han logrado su desarrollo clínico debido a deficiencias en sus propiedades farmacocinéticas.

Los compuestos de Pt(II) se caracterizan por presentar una estabilidad reducida y una baja solubilidad en disolución acuosa. Interesantemente, a pesar de su relevancia para el desarrollo clínico de nuevos fármacos de platino, los estudios tempranos acerca de estas dos propiedades son escasos. Por otra parte, la capacidad de los complejos de platino para atravesar las membranas biológicas, mediante difusión pasiva, está estrechamente relacionada con su lipofilia. Por lo tanto, la determinación de estas tres propiedades,

estabilidad, solubilidad y lipofilia, en los primeros momentos de su desarrollo, es esencial para poder llevar a cabo las modificaciones estructurales necesarias con el objetivo de evitar posibles inconvenientes en el futuro.

3.3.4.1 Estabilidad

La estabilidad de los complejos **21d** y **23**, se ha determinado mediante RP-HPLC, basándose en la reducción de los valores de absorbancia UV a 254 nm tomados sobre una misma disolución de complejo de concentración 5 μ M, a lo largo del tiempo. Las medidas se llevaron a cabo en tres medios diferentes: en disolución de NaCl 0.9%, con el objetivo de comprobar su estabilidad en el medio de administración y, además, en suero bovino (BS) y suero humano (HS) diluidos al 10% en NaCl 0.9%, con el objetivo de evaluar su estabilidad en el plasma sanguíneo, una vez administrado. Adicionalmente se determinó la estabilidad del compuesto **21d** en el mismo medio utilizado para los ensayos de citotoxicidad (suero fetal de ternera al 10% en RPMI 1640). Los resultados se muestran en la Figura 3.11.

En disolución salina ambos compuestos muestran una estabilidad elevada, encontrándose que tras 24 h, un 80% del compuesto **21d** y un 70% del compuesto **23**, permanecen inalterados (gráfica 1, Figura 3.11). Por lo tanto, sería posible su administración en disolución salina. Sin embargo, en suero (tanto humano como bovino) la estabilidad del compuesto **21d** se reduce enormemente, desapareciendo completamente a las 24 h (gráficas 2 y 3, Figura 3.11), posiblemente debido a su interacción con las proteínas presentes en el mismo.

El estudio de la estabilidad del compuesto **21d** llevado a cabo en el suero RPMI 1640 muestra una rápida desaparición del compuesto, observándose apenas un 2% a las 4 h (gráfica 4, Figura 3.11). A pesar de ello, el complejo mostró una importante actividad en los ensayos de citotoxicidad. Por lo tanto, este resultado podría implicar que, o bien la interacción del compuesto **21d** con su diana se produce rápidamente, o bien que el complejo es transformado en ese medio en otra especie activa, que es la que realmente produce la actividad antiproliferativa observada.

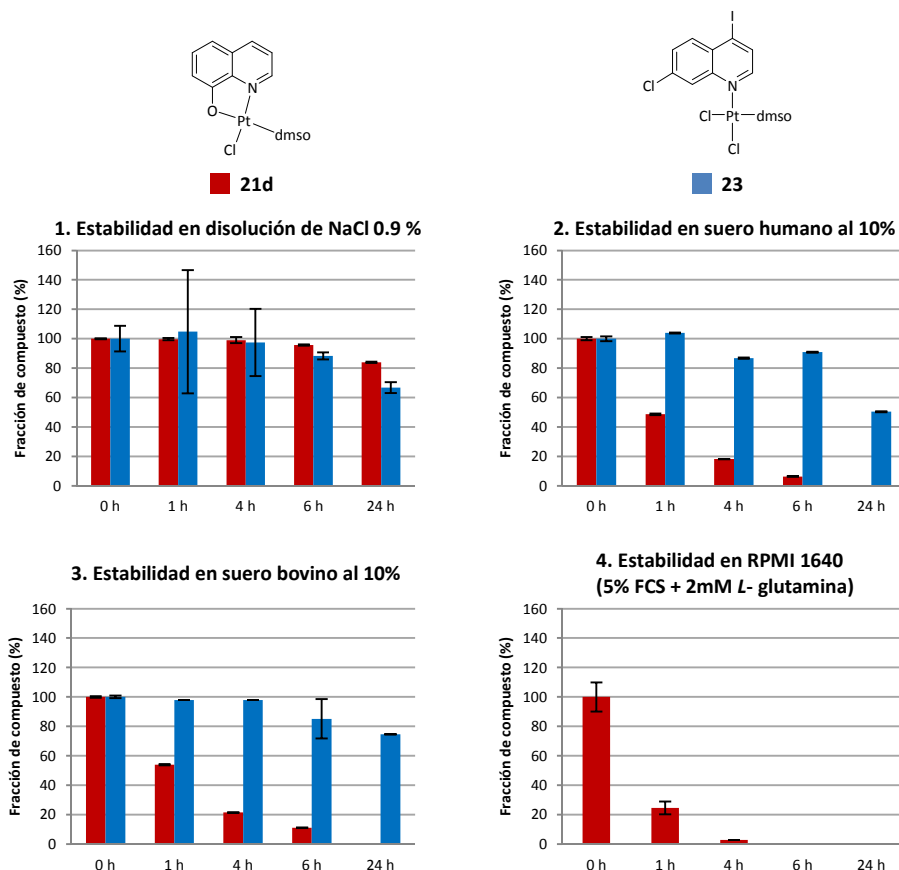


Figura 3.11

Comparación de la estabilidad de los compuestos **21d** y **23**, en disolución de NaCl 0.9% (gráfica 1), suero humano (gráfica 2.) y suero bovino (gráfica 3). Estabilidad del compuesto **21d** en el medio utilizado para los ensayos de citotoxicidad: RPMI suplementado con un 5% de suero fetal de ternera (FCS) y L-glutamina 2mM (gráfica 4).

3.3.4.2 Solubilidad

La solubilidad de los complejos **21d** y **23**, se determinó en H₂O y, además, en disolución salina de NaCl al 0.9%, ya que esta disolución es isotónica con los medios biológicos respecto al ión cloruro, y constituye el medio en el que son disueltos los compuestos de platino usados en clínica, para su administración intravenosa.

La solubilidad fue calculada mediante RP-HPLC por interpolación de la absorbancia UV de una disolución saturada de complejo, en una recta de calibrado construida a partir de las medidas de absorbancia UV de disoluciones de complejo de concentración conocida. Como puede observarse en la Figura 3.12, la solubilidad de ambos

compuestos se diferencia aproximadamente en un orden de magnitud, siendo menor la del complejo **23** (17 µg/mL y 18 µg/mL, en agua y disolución de NaCl 0.9%, respectivamente) el cual ha mostrado una menor actividad *in vitro*. La solubilidad del cisplatino (aprox. 1 mg/mL) se establece como el límite de solubilidad para un agente citotóxico de la misma potencia, que se administre parenteralmente.¹²⁴ Aunque la solubilidad del compuesto **21d** es unas diez veces menor (121 µg/mL y 93 µg/mL, en agua y disolución de NaCl 0.9%, respectivamente) que la del CDDP, su actividad *in vitro* es, en algunos casos, muy superior. Por lo tanto, su solubilidad, a pesar de ser inferior a la del cisplatino, puede no suponer un inconveniente si se mantiene su actividad *in vivo* a dosis más bajas.

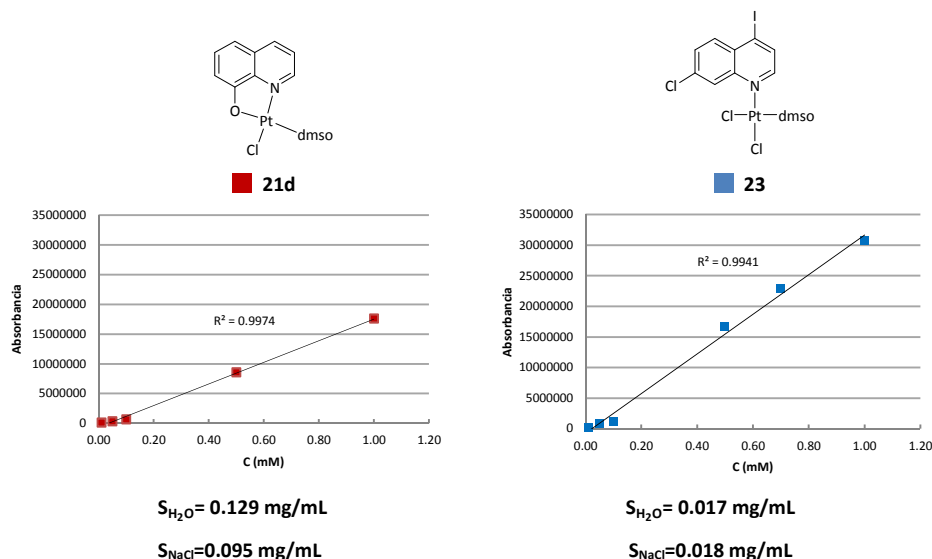
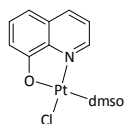


Figura 3.12

Rectas de calibrado utilizadas para el cálculo de la solubilidad de los compuestos **21e** y **23**, en H₂O y en disolución de NaCl 0.9%.

3.3.4.3 Estudio de la lipofilia

La lipofilia del compuesto **21d** se ha calculado mediante el método del matraz agitado ("shake flask"), de acuerdo a la guía 107 establecida por la OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) en el marco de sus Directrices para los Ensayos de Productos Químicos,¹²⁵ empleando en este caso la técnica de RP-HPLC para la determinación analítica de la concentración de los complejos en cada fase.



■ 21

$$\log P = \frac{[\text{complejo}]_{n\text{-octanol}}}{[\text{complejo}]_{\text{agua}}} = 2.4$$

Figura 3.13Lipofilia del compuesto **21d**.

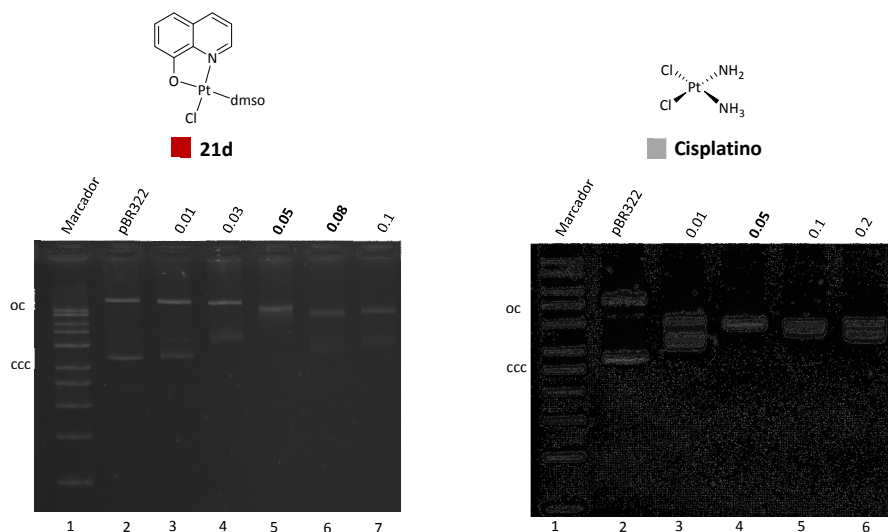
El valor positivo obtenido para la lipofilia del compuesto **21d**, indica que este complejo tiene un elevado carácter lipófilo. Su lipofilia es mucho mayor que la del CDDP ($\log P = -2.4$) y otros muchos complejos de platino, para los que la lipofilia habitualmente toma valores negativos.¹²⁶ Este valor se corresponde con el publicado recientemente para un complejo análogo de cobre,¹²⁷ demostrando que las características físico-químicas del complejo vienen determinadas en gran medida de la propiedades del ligando, el cual es altamente lipófilo. Este elevado valor de la lipofilia podría estar relacionado con una rápida acumulación intracelular del compuesto.

3.3.5 Estudio de interacción con el ADN

La mayoría de los compuestos antitumorales de platino ejercen su actividad mediante el establecimiento de interacciones covalentes con el ADN, dando lugar a aductos que producen modificaciones en su estructura terciaria, impidiendo así su replicación.

Puesto que el compuesto **21d** mostró una elevada actividad en los ensayos *in vitro*, así como unas propiedades farmacocinéticas apropiadas, se decidió evaluar su posible interacción con el ADN, mediante electroforesis en gel de agarosa en presencia del plásmido pBR322. Para ello se prepararon alícuotas con diferentes r_i ($r_i = 0.01, 0.03, 0.05, 0.08$ y 0.1), donde $r_i = [\text{complejo}]/[\text{ADN}]$, las cuales fueron previamente incubadas a 37°C durante 24 h. La interacción producida por el cisplatino se utilizó como control. En la Figura 3.14 se muestran las fotografías de los geles en los que se llevó a cabo la electroforesis.

La capacidad del compuesto **21d** para modificar la estructura terciaria del ADN se evaluó, en función de la alteración producida en la movilidad de las formas abierta, oc (banda superior desde arriba) y cerrada, ccc (banda inferior desde arriba), del plásmido, durante su migración, en comparación con la alteración causada por el cisplatino (dcha., Figura 3.14).

**Figura 3.14**

Interacción del compuesto **21d** (izqda.) y cisplatino (dcha.), con el plásmido pBR322, tras 24 h de incubación a 37 °C. Los valores de r_i utilizados se indican en la parte superior de cada fotografía. Las líneas 1 y 2 corresponden en ambas fotografías al marcador y al plásmido, respectivamente. Las dos bandas observadas en cada línea corresponden a las formas circulares abierta, oc, (1ª desde arriba) y cerrada covalentemente, ccc (2ª desde arriba).

La interacción covalente del cisplatino con el plásmido pBR322 (dcha., Figura 3.14) provoca un aumento de la movilidad de la banda oc y una reducción de la movilidad de la banda ccc (banda inferior desde arriba), llegando ambas bandas a comigrar para un valor determinado de r_i (conocido como punto de coalescencia). En la fotografía del gel correspondiente al compuesto **21d** (izqda., Figura 3.14) se observó un retraso en la movilidad de la forma ccc del plásmido, similar a la ocasionada por el cisplatino, aunque la comigración de ambas bandas o punto de coalescencia, se produjo a un valor de r_i ligeramente superior (entre 0.05 y 0.08, frente al valor de 0.05, observado para el cisplatino). Por tanto el compuesto **21d** demuestra una mayor interacción con el ADN que el cisplatino, la cual podría ser la causa de su mayor actividad antiproliferativa (Tabla 3.6).

3.4 Conclusiones

Las conclusiones que se pueden extraer de este capítulo son las siguientes:

1) La quelación a través de los átomos de N y O de los ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina es necesaria para la actividad de los complejos sintetizados. Además la diferente sustitución por átomos de I, Cl e H en la posición 7 del ligando ha demostrado ejercer un importante papel en la selectividad de los compuestos de esta serie hacia las distintas líneas celulares. De todos ellos, el complejo [PtCl(8-quinolinato) (dmsO)] (**21d**), el cual carece de átomos de halógeno sobre el ligando, es el que ha demostrado una mayor actividad, especialmente elevada en la línea WiDr. Esta actividad podría ser consecuencia de su interacción con el ADN, tal y como se desprende de los estudios de interacción con el plásmido pBR322.

2) Las propiedades farmacocinéticas determinadas para el complejo (**21d**) son apropiadas para un compuesto antitumoral de platino con su potencia.^d Su elevada estabilidad en disolución de NaCl posibilitaría su administración intravenosa, pero su solubilidad es reducida y los estudios de estabilidad en distintos tipos de suero indican que posiblemente su interacción con las proteínas del plasma sanguíneo sea alta. Sin embargo, el compuesto muestra una alta citotoxicidad *in vitro*, lo cual podría deberse a su transformación en otra especie más activa en el medio utilizado para evaluar su citotoxicidad, a una rápida acumulación intracelular del complejo mediante difusión pasiva como consecuencia de su elevado carácter lipófilo, o a un diferente mecanismo de acción, tal y como sugiere su actividad especialmente elevada en la línea WiDr, la cual está mutada en p53. En cualquier caso sería necesario en el futuro llevar a cabo su evaluación *in vivo* para determinar si se mantiene su actividad a dosis permitidas por su solubilidad.

^d En farmacología, la potencia de un fármaco se define como la cantidad de fármaco necesaria para producir la mitad de su efecto o respuesta máxima, y se cuantifica mediante la dosis eficaz 50 (DE₅₀).

3.5 Parte Experimental

3.5.1 Materiales

Los reactivos comerciales utilizados en la síntesis de los complejos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich y fueron utilizados, al igual que los disolventes disponibles comercialmente, sin purificación previa. El agua milliQ fue proporcionado por el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI) de la Universidad Autónoma de Madrid. El complejo *cis*-PtCl₂(dmsol)₂ fue sintetizado según el procedimiento descrito en la bibliografía.¹²² El medio RPMI 1640 utilizado en la evaluación biológica de los complejos fue comprado en Flow Laboratories (Irvine, UK), el suero fetal de ternera (FCS) en Gibco (Grand Island, NY), TCA y glutamina en Merck (Darmstadt, Germany) y penicilina G, estreptomycin, DMSO y sulforodamina B (SRB), en Sigma (St. Louis, MO). Las líneas celulares tumorales usadas en este trabajo: HBL-100, HeLa, SW1573 y WiDr fueron cedidas por el Prof. G. J. Peters (VU Medical Center, Amsterdam, The Netherlands). El plásmido pBR322 utilizado en los estudios de interacción con ADN fue comprado en GeneCust-thermo scientific (disolución 0.5 µg/mL).

3.5.2 Técnicas y métodos generales

Los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN, fueron realizados tal y como se indica en el capítulo 1, en el apartado 1.5.2.1. Los valores de los desplazamientos químicos (δ) se dan en ppm, tomando como referencia el valor del disolvente empleado, CDCl₃ (7.26 y 77.0 ppm para ¹H-RMN y ¹³C-RMN, respectivamente), CD₂Cl₂ (5.32 y 53.8 ppm para ¹H-RMN y ¹³C-RMN, respectivamente) o DMSO-d₆ (2.50 y 39.5 ppm para ¹H-RMN y ¹³C-RMN, respectivamente). Los espectros de ¹⁹⁵Pt-RMN se realizaron en un equipo Bruker AV-300 (64.51 MHz), y los desplazamientos químicos (δ) se dan en ppm, utilizando como referencia externa en este caso, el valor de una disolución 1.0 M de Na₂PtCl₆ en D₂O.

Los espectros de masas se obtuvieron según se indica en el apartado 1.5.2.2; empleando en este caso además, la técnica MALDI. Los puntos de fusión se obtuvieron según se indica en el apartado 1.5.2.4.

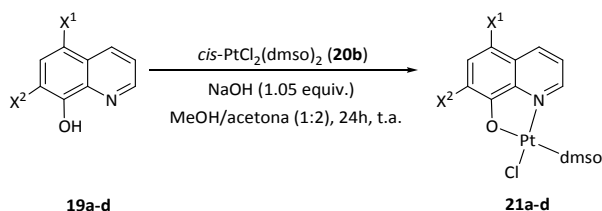
Para el estudio de las propiedades farmacocinéticas se empleó la técnica de HPLC de fase reversa (RP-HPLC), con detección UV. Los cromatogramas fueron registrados en un cromatógrafo *Agilent 1100 series*, empleando la columna de fase reversa Kromasil C-18,

5µm, y como fase móvil una mezcla de disolventes, en las condiciones indicadas en cada caso.

La técnica de electroforesis, empleada en el estudio de la interacción con el ADN, se llevó a cabo en horizontal, sobre geles de agarosa, mediante la aplicación del voltaje adecuado. Las imágenes de los geles se obtuvieron mediante una cámara fotográfica acoplada a un transiluminador UVITEC Cambridge.

3.5.3 Síntesis y caracterización de los productos

Procedimiento General 3A: Síntesis de los complejos 21a-d



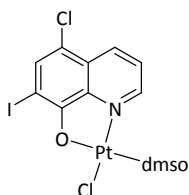
Esquema 3.3

Procedimiento experimental **3a** para la síntesis de los complejos **21a-d**.

Sobre una disolución de NaOH (1.08 mmol) en MeOH (0.9 mL) se añade la hidroxiquinolina correspondiente, **19a-d** (0.9 mmol) y acetona (0.3 mL), y se agita hasta su completa disolución, obteniéndose una disolución de color verde-amarillo. Sobre esta disolución se añade el complejo *cis*-PtCl₂(dmsO)₂, **20b** (0.9 mmol), observándose de inmediato una suspensión amarilla. Tras 24 h de agitación a t.a., el producto se filtra en microbüchner o en placa filtrante (indicado en cada caso) y el sólido se lava con H₂O y Et₂O, a 0 °C. El sólido resultante se seca en un horno a 60 °C, durante 24h.

Clorodimetilsulfóxido(5-cloro-7-yodo-8-hidroxiquinolinato)platino(II)

21a



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento general **3A**. El crudo se filtró en placa filtrante, obteniéndose el producto puro como un sólido amarillo, sin purificación posterior. **Rdto.**= 86%. Descomposición a T> 195.5 °C.

¹H-RMN (300 MHz, CD₂Cl₂) δ: 9.55 (dd, *J* = 5.5, 1.1 Hz, 1H), 8.71 (dd, *J* = 8.5, 1.1 Hz, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.62 (dd, *J* = 8.5, 5.5, 1H), 3.63 (s, 6 H).

¹³C-RMN (75 MHz, CD₂Cl₂) δ 166.4, 149.3, 138.4, 137.5, 137.4, 128.5, 122.6, 122.4 117.2, 46.7.

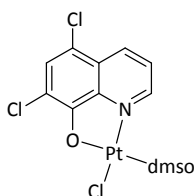
^{195}Pt -RMN (64.51 MHz, CD_2Cl_2) δ : -2737.0.

EMAR (ESI $^+$): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{INO}_2\text{PtS}$: 613,8582; encontrado: 613.8505.

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{INO}_2\text{PtS}$: C, 21.55; H, 1.64; N, 2.28. Encontrado: C, 22.04; H, 1.85; N, 2.39.

Clorodimetilsulfóxido(5,7-dicloro-8-hidroxiquinolinato)platino(II)

21b



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento general **3A**. El crudo se filtró en placa filtrante, obteniéndose el producto puro como un sólido amarillo-verde altamente insoluble, sin purificación posterior. **Rdto.** = 77%. Descomposición a $T > 236.5\text{ }^\circ\text{C}$.

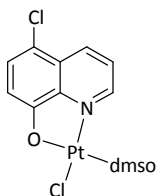
Debido a su elevada insolubilidad no fue posible registrar los espectros RMN.

EMAR (MALDI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{Cl}_3\text{NO}_2\text{PtS}$: 521.9117; encontrado: 521.9164.

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{Cl}_3\text{NO}_2\text{PtS}$: C, 25.32; H, 1.93; N, 2.68. Encontrado: C, 25.42; H, 2.04; N, 2.55.

Clorodimetilsulfóxido(5-cloro-8-hidroxiquinolinato)platino(II)

21c



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento general **3A**. El crudo se filtró en placa filtrante, obteniéndose el producto puro como un sólido amarillo-naranja sin purificación posterior. **Rdto.** = 77%. Descomposición a $T > 226.0\text{ }^\circ\text{C}$.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 9.46 (d, $J = 4.5\text{ Hz}$, 1H), 8.70 (d, $J = 8.5\text{ Hz}$, 1H), 7.58 (d, $J = 8.5\text{ Hz}$, 1H), 7.53 (dd, $J = 8.5, 5.4\text{ Hz}$, 1H), 7.16 (d, $J = 8.5\text{ Hz}$, 1H), 3.64 (s, 6 H).

^{13}C -RMN (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 165.9, 148.7, 144.1, 136.5, 129.9, 127.3, 123.2, 114.7, 113.7, 46.2.

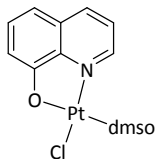
^{195}Pt -RMN (64.51 MHz, CDCl_3) δ : -2763.1.

EMAR (MALDI): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{NO}_2\text{PtSNa}$: 509.9409; encontrado: 509.9396.

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{NO}_2\text{PtS}$: C, 27.11; H, 2.28; N, 2.87. Encontrado: C, 26.29; H, 2.34; N, 2.72.

Clorodimetilsulfóxido(8-hidroxiquinolinato)platino(II)

21d



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento general **3A**, tras filtración del crudo en placa filtrante, como un sólido amarillo-naranja, sin necesidad de purificación posterior. **Rdto.**= 78%. Descomposición a $T > 197.0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

^1H -RMN (300 MHz, CD_2Cl_2) δ : 9.41 (dd, $J = 10.7, 1.2\text{ Hz}$, 1H), 8.38 (dd, $J = 8.4, 1.1\text{ Hz}$, 1H), 7.58-7.40 (m, 2H), 7.02-7.06 (m, 2H), 3.61 (s, 6H).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ : 148.6, 148.3, 140.3, 140.2, 131.5, 131.0, 121.7, 115.6, 114.6, 46.6.

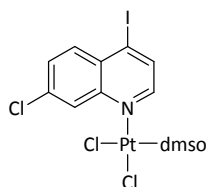
^{195}Pt -RMN (64.51 MHz, CDCl_3) δ : -2760.7.

EMAR (FAB $^+$): $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClNO}_2\text{PtS}$: 452.9915; encontrado: 452.9928.

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClNO}_2\text{PtS}$: C, 29.18; H, 2.67; N, 3.09. Encontrado: C, 29.00; H, 2.67; N, 2.94.

Diclorodimetilsulfóxido(7-cloro-4-yodoquinolina)platino(II)

23



Se disuelven 0.9 mmol de la quinolina **22**, en 0.9 mL de MeOH/Acetona 1:2, y a continuación se añade el compuesto **20b** (0.9 mmol), obteniéndose una suspensión blanca que desaparece tras unos minutos a medida que se observa la formación de una suspensión amarilla. La reacción se mantiene en agitación a t.a. durante 24 h. El producto se filtra en placa filtrante, obteniéndose

el producto puro sin necesidad de posterior purificación, como un sólido amarillo pálido. **Rdto.**= 94%. Descomposición a $T > 201.5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 9.35 (d, $J = 1.4\text{ Hz}$, 1H), 8.64 (d, $J = 5.6\text{ Hz}$, 1H), 8.12 (d, $J = 5.6\text{ Hz}$, 1H), 8.05 (d, $J = 9.1\text{ Hz}$, 1H), 7.70 (dd, $J = 8.9, 1.8\text{ Hz}$, 1H), 3.55 (s, 6H).

^{13}C -RMN (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 151.5, 135.1, 133.4, 133.1, 130.2, 129.0, 128.6, 128.2, 112.2, 44.0.

^{195}Pt -RMN (64.51 MHz, CDCl_3) δ : -3029.3.

MS-FAB: 597.6 $[\text{M}-\text{Cl}]^+$.

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{Cl}_3\text{INOtS}$: C, 20.85; H, 1.75; N, 2.21. Encontrado: C, 20.69; H, 1.79; N, 2.11.

3.5.4 Evaluación biológica

El estudio de la citotoxicidad de los compuestos de platino sintetizados se llevó a cabo en cuatro líneas celulares tumorales distintas: HBL-100, HeLa, SW1573 y WiDr. La citotoxicidad de los compuestos se determinó bajo el índice GI_{50} , definido por el NCI como la concentración de droga que causa un 50% de inhibición del crecimiento celular.

Las células se mantuvieron en incubador a 37°C, 5% CO_2 y 95% de humedad, en botellas de cultivo de 25 cm² en RPMI 1640, suplementado con un 10 % de suero fetal de ternera inactivado por calor y *L*-glutamina (2mM). Las células crecidas exponencialmente fueron tripsinizadas y resuspendidas en un medio con antibiótico (100 unidades de penicilina G y 0.1 mg de estreptomina por mL). Las suspensiones que mostraron una viabilidad >97% mediante azul de tripano fueron contadas, y posteriormente se realizaron las diluciones necesarias para obtener la densidad de células apropiada para su inoculación en placas de 96 pocillos. Las células fueron inoculadas en un volumen de 100 µl por pocillo con diferente densidad para cada línea tumoral, basada en sus respectivos tiempos de doblaje: 10,000 células por pocillo para HBL-100, 15,000 células por pocillo para HeLa, 10,000 células por pocillo para SW-1573 y 20,000 células por pocillo para WiDr.

Los compuestos **21a-d** y **23** fue inicialmente disueltos en DMSO a una concentración 400 veces superior a la final deseada. Las células control fueron expuestas a una concentración equivalente de DMSO (0,25% v/v, control negativo). Cada compuesto fue ensayado por triplicado a diferentes diluciones en el rango de 1-100 µM. El tratamiento con los compuestos se comenzó un día después del último pase y el tiempo de incubación fue de 48 horas. Pasado ese tiempo, las células se precipitaron con 25 µl de TCA y hielo seco (50% p/v) y se fijaron durante 60 minutos a 4 °C. Posteriormente, se realizó el ensayo SRB del NCI^e (National Cancer Institute) con ligeras modificaciones.¹²⁸ La densidad óptica (OD) de cada pocillo fue medida a 492 nm, utilizando un lector de absorbancia de micropocillos BioTek PowerWave XS. Los valores fueron corregidos restando la medida de fondo de OD de los pocillos que contienen solo medio. El porcentaje de crecimiento (PG) fue calculado con respecto al de las células control no tratadas (C) a cada uno de los niveles

^e P. Skehan, P. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M. R. Boyd, *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107.

de concentración, basándose en la diferencia de OD al inicio (T_0) y al final (T) de la exposición a los compuestos, de acuerdo a las fórmulas del NCI.^f Brevemente, si $T \geq T_0$, el cálculo es: $PG = 1000[(T-T_0)/(C-T_0)]$. Si $T < T_0$, lo cual indica muerte celular, el cálculo es: $PG = 1000[(T-T_0)/(T_0)]$. Con estos cálculos, un valor de 0 para PG corresponde a la cantidad de células presentes en el momento del inicio de la exposición al fármaco, mientras que un valor negativo para PG denota muerte celular neta. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.5. (apartado 3.3.3)

3.5.5 Estudio de propiedades farmacocinéticas

3.5.5.1 Estabilidad

El estudio de la estabilidad de los compuestos **21d** y **23** se llevó a cabo mediante RP-HPLC. Para ello, en primer lugar se preparó una disolución stock 0.5 mM del complejo a estudiar, en el disolvente donde fue observada una mayor solubilidad (CH_3OH en el caso del compuesto **21d** y DMSO, en el caso del compuesto **23**). Estas disoluciones fueron posteriormente diluidas 100x (hasta $5\mu\text{M}$) con: NaCl 0.9%, sueros humano o bovino al 10% en NaCl 0.9%, o RPMI suplementado con un 10% de suero fetal de ternera (FCS) inactivado por calor y *L*-glutamina (2mM), con el objetivo de reducir el contenido de DMSO o MeOH, hasta un 1% en cada uno de los cuatro medios. Después, 1 mL de estas disoluciones se incubaron con suave agitación a 37 °C en tubos Eppendorf. A tiempos 0, 1, 4, 6 y 24 h, sobre alícuotas de 100 μL de las muestras incubadas, se añadieron 200 μL de MeOH y las disoluciones resultantes se incubaron en baño de hielo durante 10 min y se sometieron a centrifugación a 5000 rpm durante 10 min., a t.a., para favorecer la precipitación de las proteínas del suero (en el caso de la estabilidad en NaCl 0.9% esto no fue necesario). El sobrenadante se aspiró cuidadosamente con una jeringa y se inyectó por triplicado en el equipo de HPLC provisto de una columna de fase reversa Kromasil C18, en las mismas condiciones empleadas para el estudio de la solubilidad. La concentración de complejo presente en cada instante se ha representado como un porcentaje del área del pico registrado en el cromatograma, con respecto al área del pico a $t=0$.

^f El NCI (National Cancer Institute) ha renombrado el índice IC_{50} como la concentración que causa el 50% de inhibición del crecimiento celular, GI_{50} , para enfatizar la corrección debida al recuento de células a tiempo cero. A. Monks, D. A. Scudiero, P. Skehan, R. H. Shoemaker, K. D. Paull, D. T. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronice, M. Vaigro-Wolf, M. Gray-Goodrich, H. Campbell, M. R. Mayo, J. *Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 757.

3.5.5.2 Solubilidad

La solubilidad de los complejos **21d** y **23**, en H₂O y disolución de NaCl al 0.9%, fue determinada mediante RP-HPLC. Para ello, a partir de disoluciones stock 1 mM de los complejos en MeOH (**21d**) o en DMSO (**23**), se prepararon diferentes diluciones de concentraciones: 1, 0.7, 0.5, 0.1, 0.05 y 0.01 mM, las cuales fueron inyectadas por triplicado en el equipo de HPLC provisto de una columna de fase reversa Kromasil C18 (sistema de elución isocrático CH₃CN/H₂O (30:70 y 70:30 para **21d** y **23**, respectivamente), flujo= 1mL/min, λ = 228 nm). El valor de la solubilidad se determinó por interpolación en dicha recta, del valor del área de pico de disoluciones saturadas de los complejos. Para obtener estas disoluciones se aisló, tras centrifugación a 5,000 rpm durante 10 min a t.a, el sobrenadante de las correspondientes disoluciones sobresaturadas, las cuales fueron previamente sonicadas durante 5 min e incubadas con fuerte agitación durante 24 h, a t.a.

3.5.5.3 Lipofilia

El valor de la lipofilia del compuesto **21d** se ha calculado como el logaritmo de su coeficiente de reparto entre *n*-octanol y agua:

$$\log P = \frac{[\text{complejo}]_{n\text{-oct}}}{[\text{complejo}]_{\text{agua}}}$$

Para ello, en primer lugar un vial de 33 mL con 10 mL de *n*-octanol y 10 mL de disolución de NaCl 6N se mantuvo con fuerte agitación a t.a. durante 24 h, con el objetivo de saturar cada fase, tras lo cual se mantuvo en reposo hasta su completa separación. A continuación, se prepararon 5 mL de una disolución 1mM del complejo **21d** en la fase orgánica, conteniendo un 1% de DMSO. A partir de esta disolución se prepararon diluciones de concentración 0.5, y 0.25 mM, en la misma fase orgánica. Las disoluciones de concentración 1, 0.5 y 0.25 mM, en *n*-octanol fueron inyectadas por triplicado en el equipo de RP-HPLC (en las mismas condiciones indicadas en los dos apartados anteriores) para construir una recta de calibrado. A continuación, sobre tubos Eppendorf conteniendo 0.5 mL de estas disoluciones, se añadió el mismo volumen de fase acuosa saturada con *n*-octanol, y las mezclas resultantes se mantuvieron con fuerte agitación durante 24 h, a t.a., tras lo cual ambas fases fueron separadas por centrifugación a 2500 rpm durante 20 min, a 20°C. A continuación, tres alícuotas de 20 μ L se aspiraron cuidadosamente de la fase acuosa y se inyectaron para su análisis en el equipo de RP-HPLC, determinándose su concentración mediante interpolación en la recta de calibrado anteriormente construida. La

concentración de complejo en la fase orgánica final se calculó como la diferencia entre su concentración en la fase orgánica inicial y en la fase acuosa final:

$$\log P = \frac{[\text{complejo}]_{n\text{-oct}}}{[\text{complejo}]_{\text{agua}}} = \frac{[\text{complejo}]_{n\text{-oct}}^{\text{inicial}} - [\text{complejo}]_{\text{agua}}^{\text{final}}}{[\text{complejo}]_{\text{agua}}^{\text{final}}}$$

3.5.6 Estudio de interacción con ADN: Interacción con el plásmido pBR322

Para llevar a cabo los estudios de interacción con ADN se prepararon muestras conteniendo 4 μL de una disolución stock del plásmido pBR322 (10 ng/mL) en Tris-HCl 10mM (pH 7.6) y 1 mM AEDT. Las muestras fueron incubadas a 37 °C con los complejos metálicos a diferentes r_i (con r_i = mol de Pt/mol de nucleótido). Para ello se añadió la cantidad de platino correspondiente a partir de disoluciones stock 10 o 50 μM de los complejos (preparadas mediante dilución con agua milliQ de una disolución de concentración 1mg/mL en DMSO), y agua milliQ hasta alcanzar un volumen total de 20 μL . Tras 24 h de incubación se añadió a cada muestra 2 μL de buffer de carga formado por 50% glicerol, 0.25% azul de bromofenol y 0.25% xileno cianol, tras lo cual el volumen total de cada muestra (20 μL) fue cargado en los pocillos de un gel de agarosa al 0.8%. La electroforesis se llevó a cabo durante un periodo de aproximadamente 2h, a 70 mV. Finalmente, el gel fue sumergido durante 30 min en 250 mL de una disolución de TAE 1X a la que previamente se añadieron 7 μL de una disolución comercial de bromuro de etidio de concentración 10mg/mL, para teñir el ADN,¹²⁹ tras lo cual el gel fue introducido en un transiluminador UVITEC Cambridge, donde fueron obtenidas las fotografías.

3.5.7 Asignación estructural del compuesto 21d

La asignación estructural del compuesto **21d** se llevó a cabo mediante difracción de rayos X, según se indica en el apartado 2.5.5. Los datos del cristal y los datos recogidos se presentan en el apartado 3.3.2, en las tablas 3.4 y 3.5, respectivamente.¹

3.6 Bibliografía

- ⁷⁴ B. Rosenberg, L. Vancamp, T. Krigas, *Nature* **1965**, 205, 698.
- ⁷⁵ E. Wiltshaw, *Platinum Metals Rev.* **1979**, 23, 90.
- ⁷⁶ M.L. Samuels, P. Y. Holoye, D. E. Johnson, *Cancer*, **1975**, 36, 318.
- ⁷⁷ L. H. Einhorn, J. Donohue, *Ann. Intern. Med.* **1977**, 87, 293.
- ⁷⁸ E. Wiltshaw, *Platinum Metals Rev.* **1979**, 23, 90.
- ⁷⁹ P. J. Dyson, G. Sava., *Dalton Trans.*, **2006**, 1929.
- ⁸⁰ G.R. Gale, C. R. Morris, L. M. Atkins, A. B. Smith, *Cancer Res.*, **1973**, 33, 813.
- ⁸¹ S. B. Howell, R. Safaei, C. A. Larson, M. J. Sailor, *Mol. Pharmacol.* **2010**, 77, 887.
- ⁸² B. G. Blair, C.A. Larson, R. Safaei, S. B. Howell, *Clin. Cancer Res.* **2009**, 15, 4312.
- ⁸³ K. K. Filipski, W. J. Loos, J. Verweij, A. Sparreboom, *Clin. Cancer Res.* **2008**, 14, 3875.
- ⁸⁴ P. A. Andrews, S. C. Mann, H. H. Huynh, K. D. Albright, *Cancer Res.*, **1991**, 51, 3677.
- ⁸⁵ M. S. Davies, S. J. Berners-Price, T. W. Hambley, *J. Inorg. Biochem.* **2000**, 79, 167.
- ⁸⁶ S. E. Miller, D. A. House, *Inorg. Chim. Acta* **1989**, 166, 189.
- ⁸⁷ A. M. J. Fichtinger-Schepman, J. L. Van der Veer, J. H. J. Den Hartog, P. H. M. Lohman, J. Reedijk, *Biochemistry* **1985**, 24, 707.
- ⁸⁸ D. Payet, F. Gaucheron, M. Sip, M. Leng, *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 5846.
- ⁸⁹ C. Pérez, M. Leng, J.-M. Malinge, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 896.
- ⁹⁰ a) Para una descripción de los aductos formados por cisplatino con el ADN, véase: A. Eastman, *Biochemistry* **1983**, 22, 3927; b) Para una descripción de los aductos con el ADN y proteínas, véase: O. Pinato, C. Musetti, C. Sissi, *Metallomics* **2014**, 26, 380.
- ⁹¹ P.M. Takahara, A.C. Rosenzweig, C.A. Frederick, S.J. Lippard, *Nature* **1995**, 377, 649.
- ⁹² D. Wang, S. J. Lippard, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2005**, 4, 307.
- ⁹³ E. Wexselblatt, E. Yavin, D. Gibson, *Inorg. Chim. Acta*, **2012**, 393, 75.
- ⁹⁴ X. Yao, K. Panichpisal, N. Kurtzman, K. Nugent, *Am. J. Med. Sci.* **2007**, 334, 115.
- ⁹⁵ M. D. Hall, M. Okabe, D.-W. Shen, X.-J. Liang, M. M. Gottesman, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2008**, 48, 495.
- ⁹⁶ J. J. Gullo, C. L. Litterst, P. J. Maguire, B. I. Sikic, D. F. Hoth, P. V. Woolley, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1980**, 21, 6.
- ⁹⁷ F. Yu, J. Megyesi, P.M. Price, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2008**, 295, F44.
- ⁹⁸ a) A. Zakovska, O. Novakova, Z. Balcarova, U. Bierbach, N. Farrell, V. Bravec; *Eur. J. Biochem.* **1998**, 254, 547; b) V. Brabec, K. Nepelchova, J. Kasparkova, N. Farrell, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, 5, 364.

- ⁹⁹ a) L. Cubo, A. Casini, C. Gabbiani, G. Mastrobuoni, L. Messori, Luigi, J. Jimenez-Barbero, C. Navarro-Ranninger, A. G. Quiroga, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9139; b) L. Cubo, A. G. Quiroga, J. Zhang, D. S. Thomas, A. Carnero, C. Navarro-Ranninger, S. J. Berners-Price, *Dalton Trans.* **2009**, *18*, 3457; c) L. Cubo, M. Groessl, P. J. Dyson, A. G. Quiroga, C. Navarro-Ranninger, A. Casini, *Chem. Med. Chem.* **2010**, *5*, 1335; d) L. Cubo, A. M. Pizarro, A. G. Quiroga, L. Salassa, C. Navarro-Ranninger, P. J. Sadler, *J. Inorg. Biochem.* **2010**, *104*, 909; e) C. Perez, V. Diaz-Garcia, A. Agudo-Lopez, V. del Solar, S. Cabrera, M. T. Agullo-Ortuno, C. Navarro-Ranninger, J. Aleman, J. A. Lopez-Martin, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *76*, 360.
- ¹⁰⁰ M. Coluccia, A. Nassi, F. Loseto, A. Boccarelli, M. A. Mariggio, D. Giordano, F. P. Intini, P. Caputo, G. Natile; *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 510.
- ¹⁰¹ C. F. Chin, D. Y. Wong, R. Jothibasu, W. H. Ang, *Curr Top Med Chem.* **2011**, *11*, 2602.
- ¹⁰² L. R. Kelland, C. F. J. Barnard, K. J. Mellish, M. Jones, P. M. Goddard, M. Valenti, A. Bryant, B. A. Murrer, K. R. Harrap, *Canc. Res.* **1994**, *54*, 5618.
- ¹⁰³ M. J. McKeage, F. Raynaud, J. Ward, C. Berry, D. Odell, L.R. Kelland, B. Murrer, P. Santabarabara, K. R. Harrap, I. R. Judson, *Clin. Oncol.* **1997**, *15*, 2691.
- ¹⁰⁴ C. Manzotti, G. Pratesi, E. Menta, R. Di Domenico, E. Cavalletti, H. H. Fiebig, L. R. Kelland, N. Farrell, D. Polizzi, R. Supino, G. Pezzoni, F. Zunino, *Clin Cancer Res.* **2000**, *6*, 2626.
- ¹⁰⁵ B. W. Harper, A. M. Krause-Heuer, M. P. Grant, M. Manohar, K. B. Garbutcheon-Singh, J. R. Aldrich-Wright, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7064.
- ¹⁰⁶ S. Dhar, F. X. Gu, R. Langer, O. C. Farokhzad, S. J. Lippard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 17356.
- ¹⁰⁷ S. D. Cummings, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1495, y referencias aquí citadas.
- ¹⁰⁸ a) C. R. Brodie, J. G. Collins, J. R. Aldrich-Wright, *Dalton Trans.* **2004**, 1145; b) S. Kemp, N. J. Wheate, D. P. Buck, M. Nikac, J. G. Collins, J. R. Aldrich-Wright, *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 1049; c) N. Shahabadi, S. Kashanian, M. Purfoulad, *Spectrochim. Acta A*, **2009**, *72*, 757; d) N. Shahabadi, S. Mohammadi, R. Alizadeh, *Bioinorg. Chem. Appl.* **2011**, Article ID 429241; e) N. Shahabadi, S. Kashanian, M. Mahdavi, N. Sourinejad, *Bioinorg. Chem. Appl.* **2011**, Article ID 525794.
- ¹⁰⁹ M. Cusumano, M. L. Di Pietro, A. Giannetto, F. Nicolò, B. Nordén, P. Lincoln, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 2416 y referencias aquí citadas.
- ¹¹⁰ Yu'ning Song, H. Xu, W. Chen, P. Zhan, X. Liu, *Med. Chem. Comm.* **2014** (Advanced Article).
- ¹¹¹ a) A. D. Schimmer, *Curr. Cancer Drug Tar.* **2011**, *11*, 325; b) K. G. Daniel, D. Chen, S. Orlu, Q. C. Cui, F. R. Miller and Q. P. Dou, *Breast Cancer Res.* **2005**, *7*, R897; c) X. Mao, X. Li, R. Sprangers, X. Wang, A. Venugopal, T. Wood, Y. Zhang, D. A. Kuntz, E. Coe, S. Trudel, D.

-
- Rose, R. A. Batey, L. E. Kay and A. D. Schimmer, *Leukemia* **2009**, 23, 585; d) D. Chen, Q. C. Cui, H. Yang, R. A. Barrea, F. H. Sarkar, S. Sheng, B. Yan, G. P. Reddy, Q. P. Dou, *Cancer Res.* **2007**, 67, 1636; e) S. M. Zhai, L. Yang, Q. C. Cui, Y. Sun, Q. P. Dou, B. Yan, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, 15, 259; f) H. Yu, Y. Zhou, S. E. Lind, W. Q. Ding, *Biochem. J.* **2009**, 417, 133; g) W. Q. Ding, B. Liu, J. L. Vaught, H. Yamauchi and S. E. Lind, *Cancer Res.* **2005**, 65, 3389; h) H. Yu, J. R. Lou and W. Q. Ding, *Anticancer Res.* **2010**, 30, 2087; i) T. Du, G. Filiz, A. Caragounis, P. J. Crouch and A. R. White, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, 324, 360.
- ¹¹² H. R. Dholariya, K. S. Patel, J. C. Patel, A. K. Patel, K. D. Patel, *Med. Chem. Res.* **2013**, 22, 5848.
- ¹¹³ B. Choi, J. Young, G. Bong, J. H. Kim, J. N. Seo, G. Wu, M. Sohn, T. N. Chung, S. W. Suh, *Neurobiol. Dis.* **2013**, 42, 382.
- ¹¹⁴ A. D. Schimmer, Y. Jitkova, M. Gronda, Z. Wang, J. Brandwein, C. Chen, V. Gupta, A. Schuh, K. Yee, J. Chen, S. Ackloo, T. Booth, S. Keays, M. D. Minden, *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2012**, 12, 330.
- ¹¹⁵ Y. Anjaneyulu, R. P. Rao, R. Y. Swamy, A. Eknath, K.N. Rao, *Proc Indian Acad Sci (Chem Sci)*. **1982**, 91, 157.
- ¹¹⁶ W. Rohde, P. Mikelens, J. Jackson, J. Blackman, J. Whitcher, W. Levinson, *Antimicrob Agents Chemother.* **1976**, 10, 234.
- ¹¹⁷ V. Prachayasittikul, S. Prachayasittikul, S. Ruchirawat, V. Prachayasittikul, *Drug Desingn, Development and Therapy* **2013**, 7, 1157.
- ¹¹⁸ a) C. W. Ritchie, *Arch. Neurol.* **2003**, 60, 1685; b) L. Lannfelt, K. Blennow, H. Zetterberg, S. Batsman, D. Ames, J. Harrison, C. L. Masters, S. Targum, A. I. Bush, R. Murdoch, J. Wilson, C. W. Ritchie, *Lancet Neurol.* **2008**, 7, 779.
- ¹¹⁹ L. Cahoon, *Nat. Med.* **2009**, 15, 356.
- ¹²⁰ Y. Biran, C. L. Masters, K. J. Barnham, A. I. Bush, P. A. Adlard, *J. Cell. Mol. Med.* **2009**, 13, 61.
- ¹²¹ J. Alemán, V. del Solar, A. Álvarez-Valdés, Carla Ríos-Luci, J. M. Padrón, C. Navarro-Ranninger, *Med. Chem. Commun.*, **2011**, 2, 789.
- ¹²² R. Cini, A. Donati, R. Giannettoni, *Inorg. Chim. Acta*, **2001**, 315, 73.
- ¹²³ a) R. Castañeda, S. A. Antal, S. Draguta, T. V. Timofeeva, V. N. Khrustalev, *Acta Cryst.E* **2014**, 70, 924; b) T. Banerjee, N. N. Saha, *Acta Cryst. C* **1986**, 42, 1408.
- ¹²⁴ E. Wong, C. M. Giandomenico, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2451.
- ¹²⁵ OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No. 107. OECD, Paris, 1995.
- ¹²⁶ Véase por ejemplo la referencia: S. P. Oldfield, M. D. Hall, J. A. Platts, *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 5227.

-
- ¹²⁷ S. Tardito, A. Barilli, I. Bassanetti, M. Tegoni, O. Bussolati, R. Franchi-Gazzola, C. Mucchino, L. Marchio, *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 10448.
- ¹²⁸ P. E. Pizao, G. J. Peters, J. van Ark-Otte, L. A. Smets, E. Smitskamp-Wilms, B. Winograd, H. M. Pinedo, G. Giaccone, *Eur. J. Cancer* **1993**, 29A, 1566.
- ¹²⁹ A. G. Quiroga, J. M. Pérez, I. López-Solera, E. I. Montero, J. R. Masaguer, C. Alonso, C. Navarro-Ranninger, *J. Inorg. Biochem.* **1998**, 69, 275.

Capítulo 4

Nuevos complejos de Au(III) con ligandos derivados de 8-hidroxiquinolina: estabilidad, citotoxicidad e interacción con citocromo c

El éxito de los compuestos de platino en el tratamiento del cáncer ha motivado el estudio de compuestos antitumorales basados en otros metales. Los compuestos de oro(III), a diferencia de los compuestos de platino(II), ejercen su acción citotóxica a través de mecanismos de acción que son independientes del ADN, exhibiendo patrones de actividad diferentes. En el presente capítulo se describe el estudio de una nueva serie de complejos de Au(III) con ligandos derivados de 8-hidroxiquinolina.

4.1 Introducción

4.1.1 Los complejos de oro(III) como agentes antitumorales

El éxito clínico del cisplatino en el tratamiento del cáncer provocó que los complejos metálicos se constituyeran como un nuevo espacio químico inexplorado, dentro del campo de la química médica bioinorgánica. Así, en un intento de mejorar las propiedades del cisplatino, y paralelamente al desarrollo de complejos de platino alternativos, se produjo un gran interés en la investigación de nuevos fármacos antitumorales basados en otros metales.¹³⁰

Debido a su similitud con los complejos de platino(II), los complejos de oro(III) fueron pronto considerados como excelentes candidatos para su evaluación antitumoral. El Au(III) es isoelectrónico con el Pt(II) (configuración electrónica externa d^8) y forma, al igual que éste, complejos con geometría planocuadrada, de modo que en principio, podrían formar el mismo tipo de aductos con el ADN y, en consecuencia, exhibir acciones biológicas similares. Sin embargo, a diferencia de los compuestos de Pt(II), los complejos de oro(III) presentan un gran inconveniente para su desarrollo farmacológico, que es su elevada inestabilidad en disolución acuosa como consecuencia de su carácter fuertemente oxidante, el cual provoca su rápida reducción a Au(I) u Au(0) en presencia de agentes reductores suaves (incluso el agua), tal y como sugieren los altos valores de sus potenciales de reducción.¹³¹ ($E_{Au^{3+}/Au^0}^0=1.42V$ y $E_{Au^+/Au^0}^0=1.68V$). Además, su mayor labilidad cinética hace que estos complejos sufran rápidamente reacciones de hidrólisis y de sustitución de sus ligandos.

Aunque durante los años 80 se evaluaron numerosos complejos de oro(III), la mayoría de los cuales mostraron en general una elevada citotoxicidad *in vitro*, los problemas de estabilidad, así como la toxicidad sistémica observada en los primeros ensayos en animales, provocaron un rápido abandono del estudio de estos complejos.¹³² Sin embargo, hacia la mitad de los años 90, fueron descritos nuevos complejos de oro(III) con perfiles de estabilidad y toxicidad mejorados, los cuales mostraron una actividad biológica *in vitro* o *in vivo*, muy prometedora. Por ejemplo, el grupo de Messori, pionero en la búsqueda de complejos de oro(III) biológicamente activos, describió en el primero de sus trabajos en este campo, la citotoxicidad, comportamiento en disolución y reactividad con biomoléculas de los complejos $AuCl_3(Hpm)$ y $AuCl_2(pm)^{133}$ (Hpm= piridilmetanol y pm= piridilmetanonato) (**A** y **B**, Figura 4.1). Estos complejos presentaban una alta estabilidad en disolventes orgánicos, y no sufrían reducción. Sin embargo en disolución acuosa sufrían una

rápida hidrólisis de uno de los ligandos cloro, lo cual limitó su aplicación clínica. El mismo tipo de estudio fue llevado a cabo sobre el complejo $\text{AuCl}_2(\text{esal})^{134a,b}$ (esal= etilsaliciladiminato) (**C**, Figura 4.1), el cual era igualmente estable en disolventes orgánicos aunque también sufría hidrólisis en disolución acuosa. Los tres compuestos mostraron una actividad citotóxica comparable a la del cisplatino en distintas líneas tumorales sensibles, siendo su potencia dos o tres veces mayor en líneas resistentes al cisplatino.

Otro tipo de complejos de oro(III) con una mejorada estabilidad fue descrito por Buckley y col., quienes evaluaron una serie de complejos de oro(III) ciclometalados, con ligandos DAMP (2-((dimetilamino)metil)fenil) (**D**, Figura 4.1) los cuales mostraron una buena actividad *in vitro*, aunque moderada en modelos animales.^{135a,b}

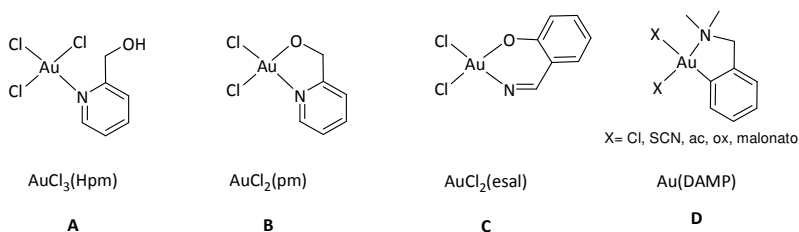


Figura 4.1

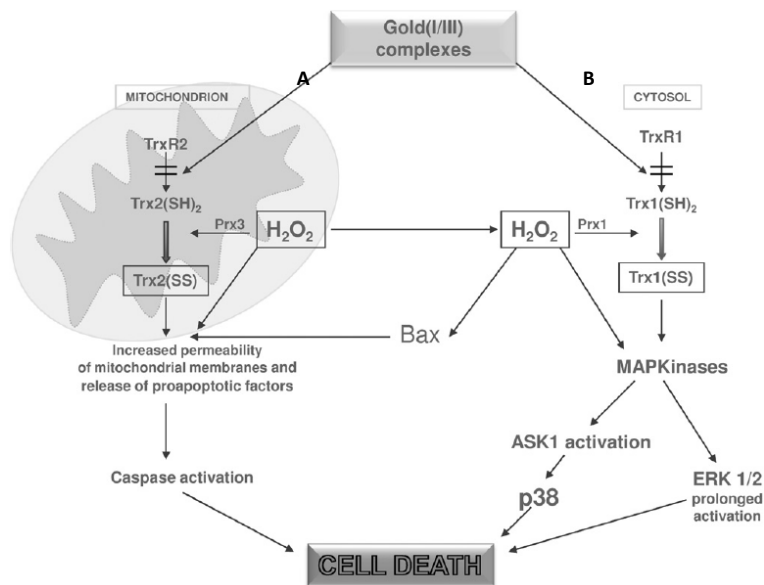
Complejos de Au(III) con ligandos derivados de piridina (**A** y **B**), con *N*-etilsalicilaldiminato (**C**) y con DAMP (**D**).

Los nuevos complejos de oro(III) eran capaces de inducir apoptosis y mostraban en general una elevada citotoxicidad *in vitro*, en el rango del bajo micromolar e incluso, nanomolar. La mayoría de ellos interaccionaban con el ADN, de modo que por analogía con los compuestos de platino, inicialmente se estableció esta interacción como el mecanismo causante de su actividad antitumoral. Sin embargo, la afinidad de estos complejos de oro(III) por el ADN era mucho menor que la de los complejos de platino(II), lo cual impedía descartar *a priori* otros mecanismos de acción.

4.1.2 Mecanismo de acción de los complejos de oro(III)

La baja afinidad de los complejos de oro(III) por el ADN en comparación con los compuestos de platino,¹³⁶ indicaba que su interacción con esta biomolécula podría no constituir su mecanismo de acción principal. Además, el hecho de que muchos compuestos mostrasen una elevada potencia en líneas tumorales resistentes, revelaba que a estos compuestos no les afectan los mecanismos de resistencia que afectan a los compuestos de

platino, confirmando la existencia de un mecanismo de acción diferente, basado probablemente en la interacción con proteínas implicadas en procesos de muerte celular.¹³² En este contexto, aunque no se ha establecido aún un mecanismo de acción general para los complejos de oro(III), una reciente hipótesis establece que éstos parecen ejercer su actividad a nivel mitocondrial, concretamente a través de la inhibición de la enzima tiorredoxina reductasa (TrxR), la cual está críticamente involucrada en la regulación redox intracelular y en las funciones mitocondriales.¹³⁷ La TrxR es una selenoenzima perteneciente a la familia de las nucleótido disulfuro reductasas (donde también se incluye la glutatión reductasa). Las enzimas de esta familia son flavoproteínas homodiméricas y en cada monómero incluyen un grupo prostético FAD, un sitio de unión de NADPH y un sitio activo redox consistente en un puente disulfuro. La TrxR contiene además un segundo sitio activo redox en el C terminal, que contiene un grupo selenocisteína (-SeCys-), el cual le confiere una amplia especificidad de sustrato. Esta enzima cataliza la reducción dependiente de NADPH, de la tiorredoxina (Trx), una ubicua proteína que es la principal disulfuro reductasa, encargada de mantener diversas proteínas celulares como la ribonucleótido reductasa, metionina sulfóxido reductasa o peroxirredoxina reductasa, en su estado reducido, teniendo esta última la función de llevar a cabo la rápida regulación del nivel de peróxido de hidrógeno intracelular.^{138a,b} Los electrones son transferidos vía FAD desde el NADPH hasta el sitio activo -SeCys- de la TrxR, que reduce entonces la Trx. El anión superóxido generado en la cadena respiratoria mitocondrial dismuta a peróxido de hidrógeno y oxida la isoforma mitocondrial de la tiorredoxina (Trx2) en una reacción mediada por la peroxirredoxina. Los complejos de oro(III) producen la inhibición de la TrxR tras su unión covalente al átomo de selenio del centro activo -SeCys-, impidiendo que la enzima pueda reducir de nuevo a la Trx2, que se acumula junto con el peróxido de hidrógeno en el interior de la mitocondria produciendo la apertura del poro mitocondrial y/o el aumento de la permeabilidad de la membrana, lo que da lugar a la liberación de factores proapoptóticos del espacio intermembrana, como el citocromo c (cyt c) o el factor de inducción de apoptosis (AIF), causando la muerte celular (**A**, Figura 4.2). Por otra parte, el peróxido de hidrógeno generado en la mitocondria es liberado al citosol, donde causa la oxidación de la isoforma citosólica de la tiorredoxina (Trx1), cuya reducción está igualmente inhibida. Después, la Trx1 estimula la ruta de las MAP kinasas, induciendo asimismo la muerte celular (**B**, Figura 4.2).

**Figura 4.2**

Esquema donde se representa el mecanismo de acción de los complejos de oro(III). (Adaptado de la ref. 132)

4.1.3 Investigación de complejos antitumorales de oro(III)

Aunque la inestabilidad de los complejos de Au(III) ha obstaculizado su desarrollo como fármacos antitumorales durante mucho tiempo, la elección de los ligandos adecuados ha permitido llevar a cabo la síntesis de diversos tipos de complejos de oro(III) estables. Interesantemente, la mayor parte de estos compuestos contiene ligandos multidentados con átomos dadores de nitrógeno los cuales, además de enlaces Au-N pueden incluir eventualmente, enlaces Au-O y Au-Cl. No obstante, también se han descrito otros tipos de compuestos de oro(III), como por ejemplo compuestos ciclometalados, con enlaces Au-C,^{139a,b} o complejos con ligandos de tipo ditiocarbamato, con enlaces Au-S,^{140a-f} con prometedores resultados A continuación se describen solo los compuestos de Au(III) con enlaces Au-N, debido a su relación con el presente capítulo.

Compuestos de oro(III) con enlaces Au-N

Tras su primer trabajo basado en complejos de oro(III) con ligandos derivados de piridina,¹³³ Messori y col. realizaron el primer intento de establecer las relaciones estructura-actividad para los complejos de oro(III). Para ello, en diversos trabajos posteriores, relacionados con el primero, llevaron a cabo un estudio sobre la citotoxicidad, interacción con ADN y comportamiento en disolución acuosa de algunos complejos planocuatros clásicos de oro(III) con diferentes estructuras químicas, los cuales contienen ligandos de tipo poliamina: $[\text{Au}(\text{en})_2]\text{Cl}_3$, $[\text{AuCl}(\text{dien})]\text{Cl}_2$, y $[\text{Au}(\text{cyclam})](\text{ClO}_4)_2\text{Cl}$ (**A**, **B** y **C**, respectivamente, Figura 4.3).^{141,142}

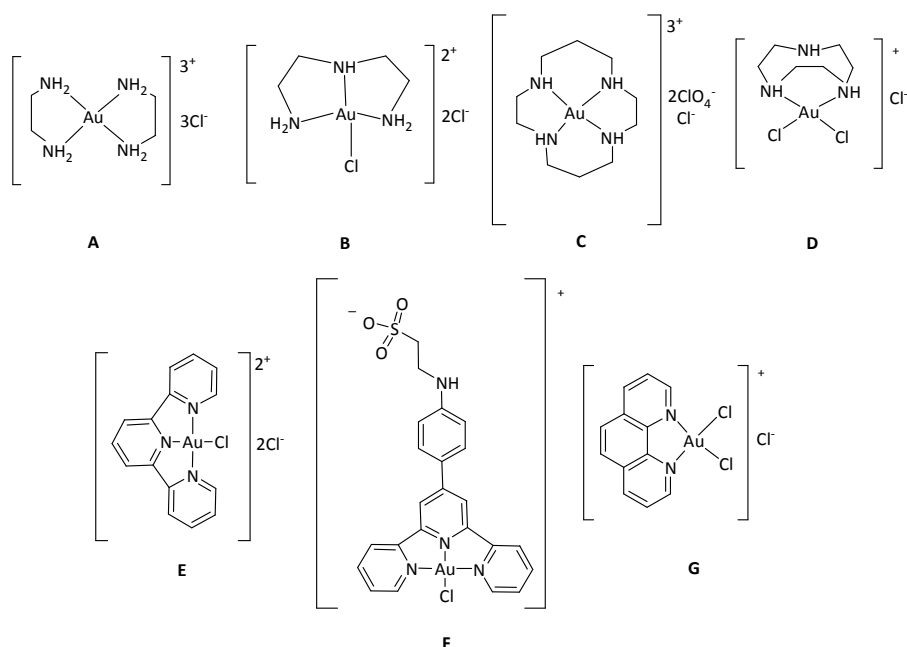


Figura 4.3

Complejos de Au(III) con ligandos de tipo poliamina (**A**, **B**, **C** y **D**), terpiridina (**E** y **F**) y fenantrolina (**G**).

A diferencia de otros complejos descritos previamente, la coordinación mediante poliaminas produjo la estabilización del estado de oxidación +3 debido al efecto donador de electrones de las aminas, obteniéndose complejos estables en disoluciones tamponadas durante horas. Debido a este efecto estabilizador, los valores de sus potenciales de reducción (entre +600 y +200 mV) se encuentran muy por debajo del valor típico para el par Au(III)/Au(0) ($E^\circ = +1.42\text{ V}$), aunque no existe una relación directa entre la actividad

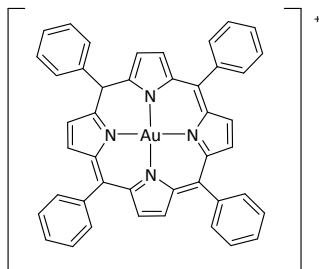
citotóxica y el valor del potencial de reducción. Así, estos complejos son solubles en agua y son estables durante horas en disoluciones tamponadas. Ambos complejos, $[\text{Au}(\text{en})_2]\text{Cl}_3$ (**A**, Figura 4.3) y $[\text{AuCl}(\text{dien})]\text{Cl}_2$ (**B**, Figura 4.3) mostraron una importante actividad citotóxica en la línea de cáncer de ovario A2780 (en el rango de 5-10 μM), sin embargo, el compuesto con el ligando etilendiamina (en), no presenta ningún ligando cloro, demostrando así que la presencia de este ligando no es imprescindible para la actividad biológica de los compuestos. A diferencia de los anteriores, el complejo $[\text{Au}(\text{cyclam})](\text{ClO}_4)_2\text{Cl}$ (**C**, Figura 4.3) resultó inactivo como consecuencia de la excesiva estabilización producida por la presencia del ligando macrocíclico. Por su parte, los ligandos etilendiamina (en) y dietilendiamina (dien) libres, no mostraron actividad, mientras que los complejos de platino con estos ligandos presentaban una citotoxicidad significativamente inferior a la de sus análogos de oro.¹⁴³ Por lo tanto la actividad de estos complejos de oro estaba relacionada con la presencia del centro de Au(III). Además, su elevada estabilidad en condiciones fisiológicas sugería que el complejo sin reducir era la especie causante de la actividad biológica. Aunque se demostró su interacción con el ADN, la elevada actividad de los complejos en la modalidad resistente de la misma línea tumoral sugería un mecanismo de acción diferente. Posteriormente fue confirmada la inhibición de la enzima TrxR mitocondrial por el complejo $[\text{AuCl}(\text{dien})]\text{Cl}_2$ ¹⁴⁴ (**B**, Figura 4.3).

Adicionalmente, Shi y col. sintetizaron un complejo estructuralmente relacionado con los anteriores con un ligando triazaciclonoanano (**D**, Figura 4.3), mostrando una actividad biológica superior a la del cisplatino en las líneas A-549 y HCT-116, y demostrándose su interacción con el ADN.¹⁴⁵

El grupo de Messori evaluó también los complejos $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]\text{Cl}_2$ y $[\text{Au}(\text{phen})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ (**E** y **G**, Figura 4.4), los cuales contienen ligandos poliheteroaromáticos de nitrógeno.¹⁴² Al igual que en el caso de los complejos con ligandos poliamina, estos complejos mostraron una elevada citotoxicidad. Sin embargo, los ligandos libres manifestaron una actividad incluso superior a la de los propios complejos (al igual que ocurre con los complejos análogos de platino). Además, los ligandos terpiridina (terpy) y fenantrolina (phen), menos básicos que las poliaminas, producen una menor estabilización del centro de Au(III), de modo que los complejos correspondientes aún muestran cierto carácter oxidante ($E^\circ = +0.62\text{V}$ y $+0.80\text{V}$, respectivamente) y son fácilmente reducidos por ascorbato sódico. Por lo tanto, la importante actividad citotóxica observada para estos complejos, parece provenir del ligando libre, tras producirse la reducción biológica del complejo y la liberación del ligando.

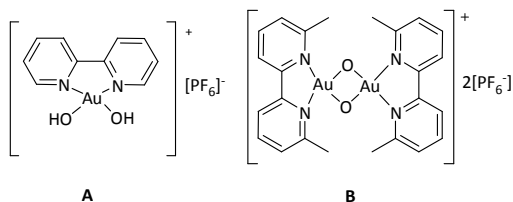
Otros complejos con ligandos terpy (**F**, Figura 4.3) han sido investigados y han mostrado igualmente una elevada citotoxicidad, superior a la del cisplatino aunque comparable a la del ligando libre, en distintas líneas tumorales.^{146 a, b} Estos complejos son estables durante 48 horas en disolución acuosa, en presencia de glutatión, un conocido agente reductor biológico, e interaccionan con el ADN, encontrándose que el contenido de oro unido al ADN aislado de células tratadas con estos complejos es comparable al de la platinación causada por el cisplatino.

Más recientemente, el grupo de Che ha desarrollado una serie de complejos de oro(III) con tetraarilporfirinas¹⁴⁷ los cuales han mostrado una excelente actividad citotóxica, tanto *in vitro* como *in vivo*. El prototipo de esta serie es la denominada "porfirina 1a" (Figura 4.4), y sus propiedades farmacológicas y mecanismo de acción han sido estudiados en profundidad, encontrándose que a diferencia de los complejos anteriormente descritos, este complejo ejerce su acción farmacológica a nivel mitocondrial, y no mediante su interacción con el ADN. Diversos estudios de función proteómica han revelado una alteración en la expresión de proteínas de múltiples rutas celulares,^{148a,b} como enzimas implicadas en la producción de energía y proteínas involucradas en el equilibrio redox. Interesantemente, se evidenció una rápida atenuación del potencial de membrana mitocondrial, produciendo alteraciones en la familia de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y la liberación tanto de citocromo c, como del factor de inducción de apoptosis (AIF), del espacio intermembrana. Seguidamente, el citocromo c inicia la ruta de apoptosis dependiente de caspasas, tras producir la activación de caspasa-3 y caspasa-9, mientras que el factor AIF se trasloca al núcleo celular iniciando la ruta apoptótica independiente de caspasas. Los autores demostraron que la toxicidad del complejo no está relacionada con sus propiedades fotosensibilizadoras y que el complejo interacciona con el ADN de forma no covalente, arrojando parcialmente el ciclo celular en las fases G(0)-G(1). Tanto la inducción de apoptosis como del arresto celular son independientes de p53.¹⁴⁹ Estudios más detallados indican que la "porfirina 1a" es capaz de activar las proteínas kinasas activadas por mitógenos, p38^{MAPK} y ERK, proceso en el cual la permeabilización de la membrana mitocondrial juega un papel fundamental.¹⁵⁰ En resumen, estos complejos con ligandos porfirinas han demostrado inducir apoptosis a través de mecanismos tanto dependientes como independientes de caspasas. Además los ROS juegan un papel importante debido a su capacidad para regular el potencial de la membrana mitocondrial.

**Figura 4.4**

Complejo de Au(III) con un ligando porfirina: "porfirina 1a".

En el año 2002, el grupo de Messori desarrolló también distintos complejos con ligandos basados en la 2,2-bipiridina, como el complejo $[\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2][\text{PF}_6]$ (**A**, figura 4.5), el cual mostró una importante actividad citotóxica, aunque era reducido en presencia de ascorbato.¹⁵¹ Con el objetivo de mejorar su estabilidad frente a la reducción, desarrolló una serie de oxocomplejos dinucleares de Au(III) con ligandos bipiridina, con fórmula general $[\text{Au}_2(\text{N,N})_2(\mu\text{-O})_2][\text{PF}_6]$.¹⁵² Estos complejos dinucleares se caracterizan por su adecuada solubilidad y estabilidad en disoluciones tamponadas. El complejo Auxo6 (**B**, Figura 4.6) resultó el más activo de la serie, el cual es capaz de interactuar con el ADN y con diversas proteínas modelo tras la pérdida de los ligandos bipiridina. Sin embargo, la interacción con proteínas parece estar mediada por procesos redox, de manera que los complejos Auxo son en realidad una fuente de complejos de Au(I), siendo éstos los que reaccionan con distintas proteínas y por lo tanto, los causantes de la actividad biológica.

**Figura 4.5**

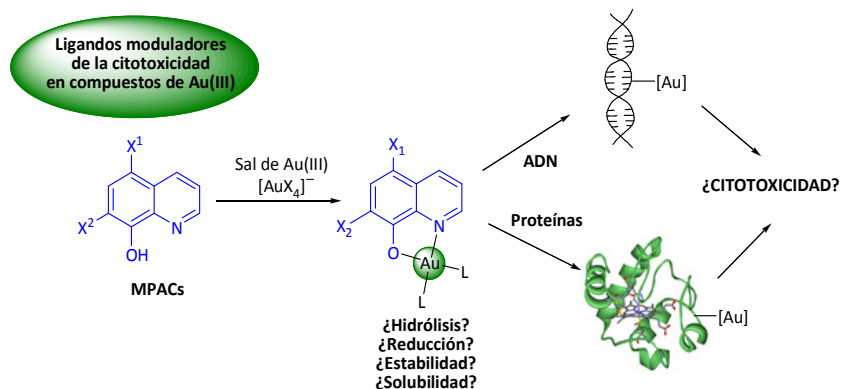
Distintos complejos de Au(III) con ligandos bipiridina.

4.2 Objetivos

El desarrollo de fármacos antitumorales basados en metales con perfiles farmacológicos distintos a los derivados de platino utilizados en clínica, es uno de los objetivos principales de la química médica moderna. Puesto que en general, los complejos de oro(III) muestran una elevada citotoxicidad como consecuencia de mecanismos de acción independientes del ADN, estos se han constituido como una importante clase emergente de potenciales agentes antitumorales. Desafortunadamente, la inestabilidad de los complejos de oro(III) en condiciones fisiológicas continúa siendo un parámetro crítico en la investigación de estos compuestos en la actualidad. Sin embargo, la elección de los ligandos adecuados, principalmente ligandos multidentados de nitrógeno, tanto alifáticos como aromáticos, ha permitido estabilizar el estado de oxidación del centro de Au(III).

Recientemente, la utilización de ligandos poliaromáticos de nitrógeno basados en clioquinol (un derivado de 8-hidroxiquinolina perteneciente a un grupo de fármacos conocidos como MPACs) nos ha permitido llevar a cabo la síntesis, evaluación citotóxica y determinación de las propiedades farmacocinéticas de una nueva serie de complejos de Pt(II), con interesantes resultados.¹⁵³ Estos complejos de platino mostraron una elevada citotoxicidad *in vitro* (en algunos casos superior a la del cisplatino, con valores de IC₅₀ entre 1.8 y 28 μ M), una alta estabilidad en disolución de NaCl 0.9% (durante aprox. 24 horas), y una lipofilia muy superior a la de otros complejos de platino descritos (log P= 2.4).

En consecuencia, debido al interés actual en el desarrollo de compuestos antitumorales basados en otros metales, en este capítulo nos planteamos como objetivo principal el desarrollo de una serie análoga de complejos de Au(III) basados en ligandos derivados de 8-hidroxiquinolina. Por una parte, el efecto quelato producido por la coordinación al centro de Au(III) del ligando bidentado de hidroxiquinolina, a través de un átomo dador de nitrógeno, produciría la estabilización del complejo, lo que constituye uno de los principales retos en el desarrollo de complejos de oro(III). Por otra parte la elevada lipofilia de los derivados de 8-hidroxiquinolina (la cual les permite incluso atravesar la barrera hematoencefálica) facilitaría al complejo su entrada en la mitocondria, donde es conocido que ejercen su acción antitumoral la mayoría de los complejos de oro(III) descritos en la bibliografía.

**Figura 4.6**

Posible acción citotóxica de los complejos de Au(III) con ligandos derivados de 8-hidroxiquinolina.

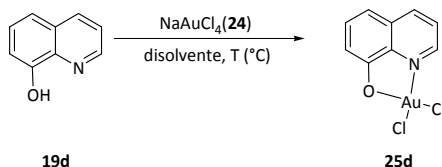
Para llevar a cabo el objetivo principal de este capítulo, nos planteamos los siguientes:

- 1) Optimización y síntesis de una serie de complejos de Au(III) con ligandos basados en 8-hidroxiquinolina, 8-aminoquinolina y quinolina.
- 2) Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de los complejos y estudio del efecto que ejercen en dicha actividad factores como: la sustitución por halógenos en distintas posiciones del ligando, el modo de coordinación de éste a metal, el tipo de átomos dadores o la naturaleza eléctrica de los complejos.
- 3) Estudio de la interacción de los complejos con el ADN mediante electroforesis y de su interacción con citocromo c mediante espectrometría de masas MS-ESI+.
- 4) Medida de la estabilidad de los complejos frente a la reducción, mediante el establecimiento de sus propiedades electroquímicas empleando la técnica de voltamperometría cíclica.

4.3 Resultados y Discusión

4.3.1. Síntesis de los complejos

La optimización de las condiciones de reacción para la síntesis de los complejos se llevó a cabo para la reacción entre la 8-hidroxiquinolina (**19d**) y la sal de oro(III): NaAuCl₄ (**24**). En primer lugar se llevó a cabo la reacción con 1.0 equiv. de **19d**, empleando una mezcla de disolventes MeOH/acetona (1:2) (entrada 1, Tabla 4.1). Sin embargo, en estas condiciones se observa la rápida formación de un precipitado negro, probablemente debido a la reducción de Au(III) a Au(0). El empleo de MeOH dio lugar a una mezcla compleja (entrada 2, Tabla 4.1), al igual que ocurrió utilizando agua como disolvente (entrada 3, Tabla 4.1). En nuestro trabajo previo con compuestos de platino se encontró que el empleo de NaOH facilitaba la quelación del ligando al centro metálico, lo cual permitió obtener un único producto de reacción. Desafortunadamente, el empleo de NaOH en este caso, tanto en MeOH como en H₂O, únicamente produjo la reducción del metal (entradas 4 y 5, Tabla 4.1). Puesto que el empleo de una base no proporcionó el producto deseado, se llevó a cabo la reacción en MeOH y sin base, pero durante un tiempo mayor (24 h). De esta forma se pudo obtener el complejo **25d** como único producto de la reacción, aunque con un moderado rendimiento del 38% (entrada 6, Tabla 4.1). La misma reacción, en agua y a una temperatura de 50°C, proporcionó de nuevo una mezcla de complejos (entrada 7, Tabla 4.1). El empleo de 0.8 equiv. de ligando no modificó el rendimiento (entrada 8, Tabla 4.1), sin embargo, el uso de 1.2 equiv. de **19d** incrementó el rendimiento de la reacción, hasta el 46% (entrada 9, Tabla 4.1). Por lo tanto, estas condiciones, fueron las elegidas para proceder a la síntesis del resto de los complejos de la serie.

Tabla 4.1Optimización de la reacción para la síntesis del complejo con 8-hidroxiquinolina, **25a**.^a

Entrada	Disolvente	Condiciones (tiempo)	Rdto. (%)
1	MeOH/Acetona (1:2)	1 equiv. 19d (15h)	Reducción
2	MeOH	1 equiv. 19d (15h)	Mezcla compleja
3	H ₂ O	1 equiv. 19d (2h)	Mezcla compleja
4	MeOH	1 equiv. 19d + 1 equiv. NaOH (24h)	Reducción
5	H ₂ O	1 equiv. 19d + 1 equiv. NaOH (40 min)	Reducción
6	MeOH	1 equiv. 19d (24h.)	(25d) 38
7	H ₂ O	1 equiv. 19d (2h) 50°C	Mezcla compleja
8	MeOH	0.8 equiv. 19d (24h.)	(25d) 39
9	MeOH	1.2 equiv. 19d (24h.)	(25d) 46

^a Todas las reacciones se llevaron a cabo a una escala de reacción de 0.14 mmol de **19d** en 0.45 mL del disolvente indicado en cada caso.

Empleando las condiciones óptimas (entrada 9, Tabla 4.1) se procedió a la síntesis de distintos complejos de Au(III) a partir de diferentes ligandos derivados de 8-hidroxiquinolina, con diferente sustitución por átomos de halógenos en las posiciones X¹ y X². Así se pudo obtener el complejo **25c**, con un buen rendimiento del 76% (entrada 2, Tabla 4.2). Desafortunadamente los intentos realizados para sintetizar otros complejos con sustituyentes halógenos en la posición X¹, fueron infructuosos, no teniendo lugar la reacción en ningún caso (entradas 3 y 4, Tabla 4.2).

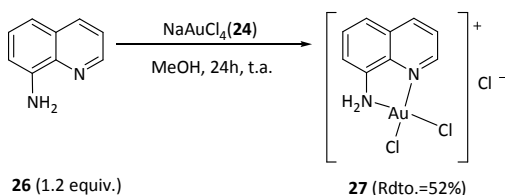
Tabla 4.2Alcance de la reacción.^a

$\text{19a-d (1.2 equiv.)} \xrightarrow[\text{MeOH, 24h, t.a.}]{\text{NaAuCl}_4\text{(24)}} \text{25a-d}$

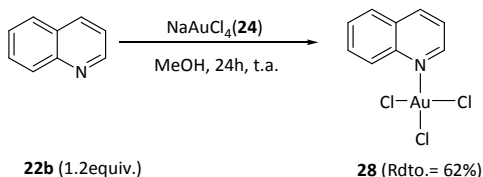
Entrada	Ligando	X ¹	X ²	Rdto.(%)-compuesto
1	19d	H	H	46-25d
2	19c	Cl	H	76-25c
3	19b	Cl	Cl	n.r. ^b
4	19a	Cl	I	n.r. ^b

^a Todas las reacciones se llevaron a cabo a una escala de reacción 0.17mmol de los compuestos **19a-d**, en 0.45 mL de MeOH, durante 24 horas. y a t.a. ^b La reacción no tiene lugar.

Además, con el objetivo de evaluar la influencia de la naturaleza de los átomos que forman el quelato en las propiedades de los complejos, se decidió sintetizar un complejo con el ligando 8-aminoquinolina (**26**), obteniéndose el complejo **27** con un rendimiento del 52% (Esquema 4.1).

**Esquema 4.1**Síntesis del complejo **27** con el ligando 8-aminoquinolina (**26**).

Finalmente, con el propósito de evaluar la influencia de la presencia o ausencia del anillo quelato en los complejos, se llevó a cabo la síntesis de un complejo no quelado (**28**), partiendo del ligando quinolina, **22b**, (Esquema 4.2).

**Esquema 4.2**

Síntesis de un complejo no quelato con el ligando quinolina.

4.3.2 Asignación estructural del compuesto 25d

El compuesto **25d** fue cristalizado, obteniéndose monocristales aptos para su análisis mediante difracción de rayos X. El ORTEP obtenido, el cual confirma la estructura de los compuestos sintetizados, se muestra en la Figura 4.7.

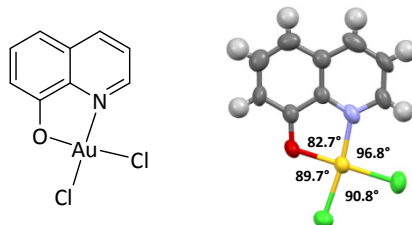


Figura 4.7

Compuesto **25d** (izqda.) y su ORTEP (dcha.) mostrando los ángulos de enlace en torno al centro metálico.

El resultado del análisis por difracción de rayos X de uno de los monocristales obtenidos muestra que existe una molécula por cada celdilla unidad. Los datos cristalográficos se presentan en la Tabla 4.3. Los valores de las longitudes de enlace y de los ángulos más característicos de la molécula se muestran en la Tabla 4.4.^a La molécula presenta una geometría plana, pero no cuadrada, ya que la formación del quelato entre los átomos de N y O del ligando, y el metal, distorsiona el entorno planocuadrado del Au(III) de tal forma que los ángulos N(1)-Au(1)-O(1) y N(1)-Au(1)-Cl(1) toman los valores de 82.7° y 96.8°, respectivamente, los cuales están alejados del valor de 90° que correspondería a un entorno puramente planocuadrado. Por otra parte, los valores más altos de los esperados para las longitudes de los enlaces Au(1)-Cl(1) (2.276 Å) y Au(1)-Cl(2) (2.264 Å) revelan una ligera influencia *trans* del ligando.

^a Los datos cristalográficos correspondientes al compuesto **25d** han sido depositados en la base de datos CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre) con el número: 986616.

Tabla 4.3Datos cristalográficos del compuesto **25d**.

Fórmula empírica	C ₉ H ₆ AuCl ₂ NO	Volumen (Å³)	1006.7(6)
Peso molecular	412.01	Densidad calculada (mg/cm³)	2.718
Longitud de onda	0.71073	Coefficiente de absorción (mm⁻¹)	15.105
Sistema cristalino	Monoclínico	F(000)	2240
Grupo espacial	P 1 21/n 1	Reflexiones recogidas	20653
Z	8	Reflexiones observadas	4837
Parámetros celdilla	a (Å) 4.2289(13) b (Å) 17.357(6) c (Å) 13.814(5) α (°) 90 β (°) 96.859(17) γ (°) 90	Transmisión max. y min Índices R finales [I > 2 σ (I)]: R1 wR2 Bondad del ajuste, S	0.891 y -1.112 0.0283 0.0595 1.017

Tabla 4.4Longitudes (Å) y ángulos de enlace (°) significativos del compuesto **25d**.

Entrada	Átomos	Longitud de enlace (Å)	Ángulo de enlace (°)
1	Au(1)-N(1)	2.017(9)	-
2	Au(1)-O(1)	2.016(7)	-
3	Au(1)-Cl(1)	2.276(3)	-
4	Au(1)-Cl(2)	2.264(3)	-
5	N(1)-Au(1)-O(1)	-	82.7(3)
6	N(1)-Au(1)-Cl(1)	-	96.8(3)
7	O(1)-Au(1)-Cl(2)	-	89.7(2)
8	Cl(1)-Au(1)-Cl(2)	-	90.78(11)
9	O(1)-Au(1)-Cl(1)	-	178.9(2)
10	N(1)-Au(1)-Cl(2)	-	172.3(3)

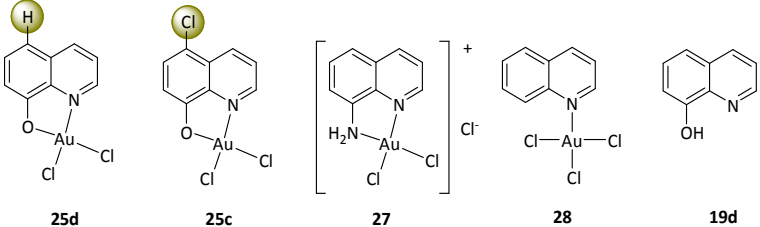
4.3.3 Evaluación de la actividad antitumoral

La evaluación de la citotoxicidad de los complejos sintetizados se ha realizado frente al mismo panel de líneas tumorales empleado para la evaluación de los complejos análogos de platino: **HBL-100** (carcinoma de mama), **HeLa** (adenocarcinoma de cérvix), **SW1573** (carcinoma alveolar de pulmón) y **WiDr** (adenocarcinoma colorrectal). Además, puesto que los complejos de oro(III) se caracterizan por su mayor labilidad cinética con respecto al platino(II), se ha evaluado la citotoxicidad de un ligando libre, **19d**, con el objetivo de determinar si la actividad de los complejos pudiera deberse a la liberación del ligando derivado de 8-hidroxiquinolina. El estudio de la citotoxicidad fue realizado por el grupo del Doctor J. M. Padrón, de la Universidad de La Laguna (Tenerife, España).

La actividad citotóxica se ha determinado como el valor de GI_{50} , mediante el ensayo SRB, tras 48 horas de tratamiento. Los resultados se muestran en la Tabla 4.5, donde se muestran también los valores obtenidos para el cisplatino (CDDP), en las mismas condiciones.

Tabla 4.5

Actividad antiproliferativa (GI_{50} , μM) de los compuestos **25c-d**, **27-28**, el ligando **19d** y CDDP, en líneas celulares representativas de distintos tumores humanos sólidos.^a

					
	25d	25c	27	28	19d
Entrada	Complejo	HBL-100	Hela	SW1573	WiDr
1	25d	5.8 (± 1.2)	4.1 (± 0.5)	3.7 (± 1.6)	52.0 (± 29)
2	25c	2.1 (± 0.87)	2.5 (± 0.47)	1.7 (± 1.0)	7.6 (± 3.0)
3	27	32 (± 23)	18 (± 1.2)	10 (± 2.4)	66 (± 48)
4	28	69 (± 43)	59 (± 57)	19 (± 0.75)	100 (-)
5	19d	54 (± 14)	28 (± 0.64)	3.6 (± 0.62)	71 (± 41)
6	CDDP	1.9 (± 0.16)	2.0 (± 0.32)	3.0 (± 0.37)	26 (± 5.3)

^a Los datos se han recogido tras 48 horas de exposición a los compuestos. Los valores se dan en μM (entre paréntesis se indica la desviación estándar para 3-5 experimentos).

Los complejos quelatos **25d**, **25c** y **27** mostraron idéntica tendencia de citotoxicidad en las líneas tumorales ensayadas, no apreciándose selectividad por parte de ninguno de ellos hacia una línea tumoral en particular (véase Figura 4.8). En general, los compuestos **25d** y **25c** presentaron una actividad similar al cisplatino en las líneas HBL-100, HeLa y SW1573, siendo ligeramente superior la del complejo **25c** en las tres líneas. Sin embargo, en la línea WiDr, mutada en p53 y por lo tanto más resistente, se observó una marcada diferencia entre ambos y, en esta línea, el complejo **25c** mostró una actividad citotóxica muy superior (GI_{50} = 7.6 μM) a la del complejo **25d** (GI_{50} = 52.0 μM) y también a la del cisplatino (GI_{50} = 26 μM). Este resultado sugiere que al complejo **25c** no le afectan los mecanismos de resistencia que afectan al cisplatino y, en consecuencia su actividad antiproliferativa podría ser debida a un mecanismo de acción diferente. El compuesto **27**, un complejo catiónico con un puente nitrogenado, presenta en todas las líneas una

citotoxicidad significativamente inferior a la de los complejos **25d** y **25c**, e inferior a su vez a la del cisplatino.

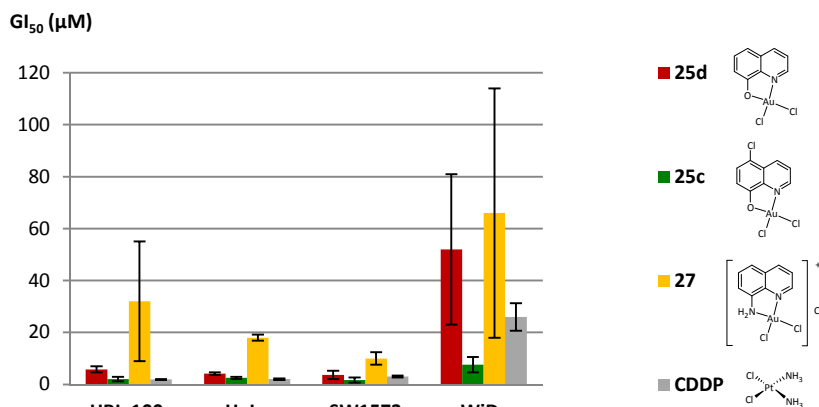
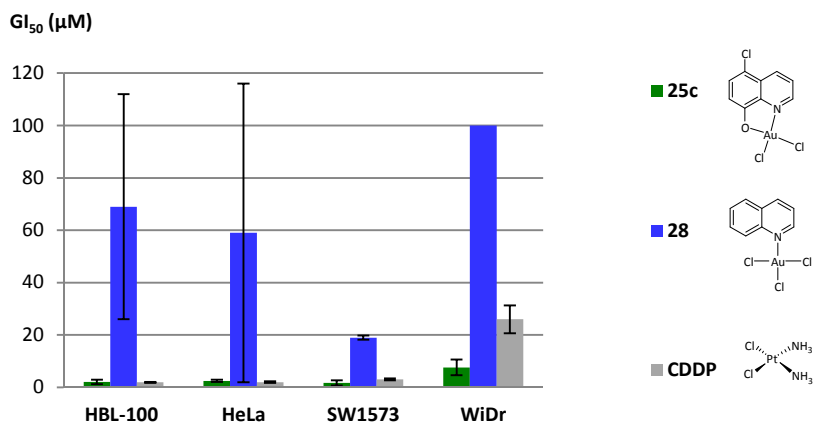


Figura 4.8

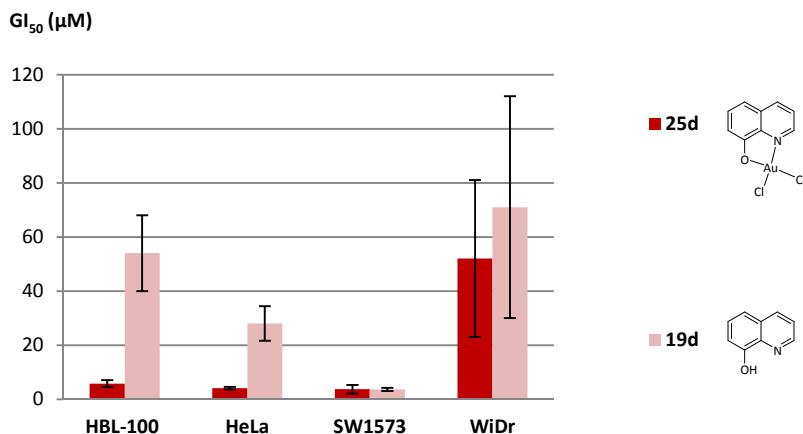
Comparación de la actividad antiproliferativa (GI_{50} , μM) de los compuestos quelatos **25c-d**, **27**, y CDDP, en líneas celulares representativas de distintos tumores humanos sólidos.

Al igual que ocurría con los complejos análogos de platino(II), el modo de coordinación del ligando influyó notablemente en la actividad citotóxica de los complejos (Figura 4.9). Así, el complejo no quelado **28** presentó en todas las líneas tumorales, una citotoxicidad muy inferior (GI_{50} = 19-100 μM) a la de los complejos quelados (GI_{50} = 1.7-66 μM), especialmente en la línea WiDr.

Adicionalmente, se evaluó la actividad antiproliferativa del ligando libre **19d** en las mismas condiciones, con el objetivo de esclarecer si la actividad de los complejos, cuya estabilidad en disolución ha sido también estudiada (véase apartado 4.3.4), podría deberse a la liberación del ligando (Figura 4.10). Los resultados indican que a excepción de la línea SW1573, el ligando **19d** presenta una actividad citotóxica muy inferior a la del complejo **25d**, indicando por tanto, que en estas líneas, la actividad del complejo **25d** no es consecuencia de la liberación del ligando.

**Figura 4.9**

Comparación de la actividad antiproliferativa (GI_{50} , μM) del complejo quelato más activo, **25c**, y el complejo no quelado, **28**, frente a CDDP, en líneas celulares representativas de distintos tumores humanos sólidos.

**Figura 4.10**

Actividad antiproliferativa (GI_{50} , μM) del compuesto **3a** y del ligando **1a**, en líneas celulares representativas de distintos tumores humanos sólidos.

Los resultados obtenidos en este panel de líneas tumorales indican que los complejos de Au(III) con este tipo de ligandos muestran una actividad antiproliferativa similar a la obtenida para los compuestos análogos de Pt(II), en el rango de micromolar (GI_{50} Pt(II)= 1.9-54 μM , GI_{50} Au(III)= 1.7-100 μM). En ambas series, los complejos quelatos con los ligandos 8-hidroxiquinolinato y 5-Cl-8-hidroxiquinolinato son los más activos, sin

embargo, puede distinguirse una diferente tendencia para cada serie (véase Figura 4.11). Así, en el caso de la serie de complejos de Pt(II), el complejo PtCl(dmsO)(8-hidroxiquinolinato), **21d**, presentó en todas las líneas una actividad citotóxica ligeramente superior. Sin embargo, en el caso de la serie de complejos de Au(III), el complejo AuCl₂(5-Cl-8-hidroxiquinolinato), **25c**, es el complejo con mayor actividad citotóxica, en especial en la línea WiDr.

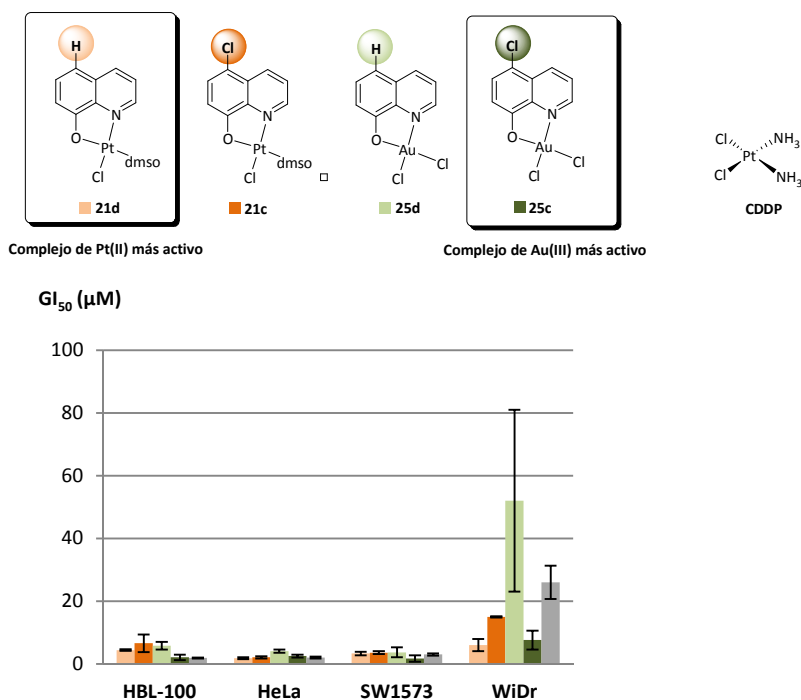


Figura 4.11

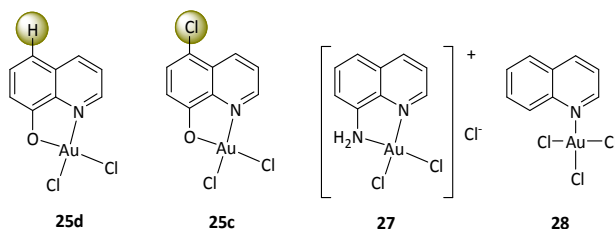
Comparación de la actividad antiproliferativa (GI₅₀, μM) de los complejos de Pt(II) y Au(III) con los ligandos 8-hidroxiquinolinato y 5-Cl-8-hidroxiquinolinato.

La citotoxicidad de los complejos **25c-d** y **27-28** fue evaluada además frente a otro grupo de cuatro líneas tumorales: **A427** (cáncer de pulmón), **LCLC** (cáncer de pulmón de células grandes), **SISO** (adenocarcinoma de útero) y **5637** (carcinoma de vejiga), las cuales se incluyen en un panel de más de 60 líneas tumorales utilizadas por el NCI (National Cancer Institute) en su programa de desarrollo de fármacos.¹⁵⁴ El estudio de la citotoxicidad en este panel celular fue llevado a cabo por el grupo del Profesor P. Bednarski, de la Universidad de Greifswald (Alemania). Los valores de citotoxicidad se han determinado mediante el método del cristal violeta, tras 96 horas de exposición a los

complejos. Los resultados se muestran en la Tabla 4.6, donde también se incluyen los valores obtenidos para el cisplatino en las mismas condiciones.

Tabla 4.6

Actividad antiproliferativa (GI_{50} , μM) de los compuestos **25c-d**, **27-28** y CDDP, en líneas celulares representativas de distintos tumores humanos sólidos, utilizadas por el NCI.^a



Entrada	Complejo	A427	LCLC	SISO	5637
1	25d	0.374 (± 0.174)	0.260 (± 0.160)	0.312 (± 0.080)	0.229 (± 0.223)
2	25c	0.192 (± 0.091)	0.220 (n.d.) ^b	0.402 (± 0.284)	0.058 (± 0.022)
3	27	0.228 (n.d.)	0.294 (n.d.)	0.727 (± 0.425)	0.263 (± 0.2186)
4	28	n.d.	>10	>10	n.d.
6	CDDP	1.9 (± 1.54)	0.90 (± 0.19)	0.24 (± 0.06)	0.35 (± 0.10)

^a Los datos se han recogido tras 96 horas de exposición a los compuestos. Los valores se dan en μM (entre paréntesis se indica la desviación estándar para 3-5 experimentos). ^b n.d.: no determinado.

Sorprendentemente, en estas líneas celulares los complejos **25c-d** y **27** mostraron una citotoxicidad muy superior con respecto al panel anterior, con valores de GI_{50} en el rango del alto nanomolar (58-402 nM), superiores en todas las líneas excepto en la línea SISO, a los del cisplatino. Al igual que en el caso del primer panel de líneas tumorales, los tres compuestos presentaron una tendencia de citotoxicidad similar en todas las líneas (véase comparación en Figura 4.12), y la variación de los sustituyentes sobre el ligando o la naturaleza de sus átomos dadores, no provocaron un cambio sustancial en la actividad antiproliferativa de los compuestos. El cambio de un grupo OH por un grupo NH_2 en la posición 8 del ligando sólo redujo ligeramente la actividad antiproliferativa de los complejos, si bien de nuevo el complejo **27**, con dos átomos de nitrógeno, fue en general menos activo que los complejos **25d** y **25c**. Los complejos **25d** y **25c**, quelados a través de un átomo de oxígeno, presentaron una actividad citotóxica similar en todas las líneas, aunque la actividad del complejo **25c**, volvió a ser en general, ligeramente superior, especialmente en la línea 5637, donde su actividad antiproliferativa fue del orden del bajo

nanomolar (58nM), siendo aproximadamente cuatro veces inferior a la del compuesto **25d** (229nM).

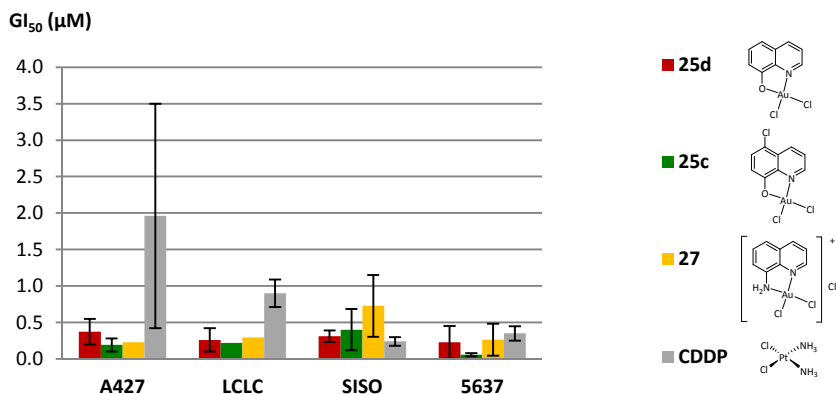


Figura 4.12

Actividad antiproliferativa (GI_{50} , μM) de los complejos quelatos **25c-d**, **27** y el cisplatino (CDDP), en líneas celulares representativas de distintos tumores humanos sólidos.

Finalmente, en este panel celular la ausencia del quelato produjo, como en el caso del panel anterior, o en el caso de la serie homóloga de platino, una disminución pronunciada de la actividad citotóxica (Figura 4.13). Así de nuevo, el complejo no quelado **28** fue el menos activo de todos los complejos, el cual mostró valores de GI_{50} superiores a 10 en las líneas LCLC y SISO (su actividad en las líneas A427 y 5637 no fue determinada).

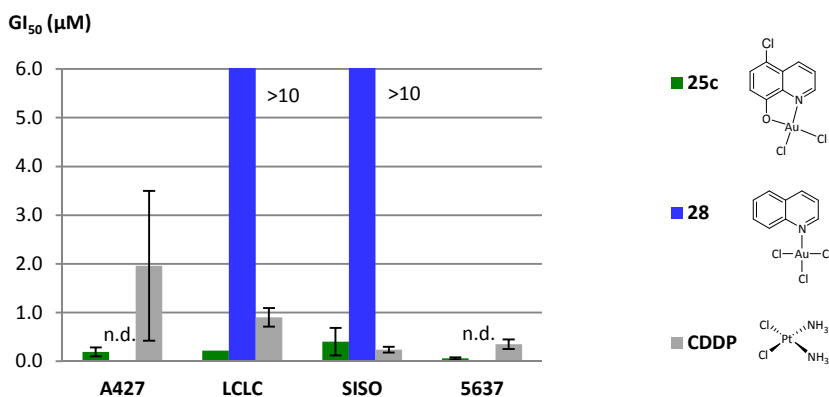


Figura 4.13

Comparación de la actividad antiproliferativa (GI_{50} , μM) del compuesto más activo, **25c**, el menos activo, **28**, y el cisplatino (CDDP). n.d.: no determinado.

4.3.4 Estudio del comportamiento en disolución

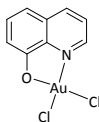
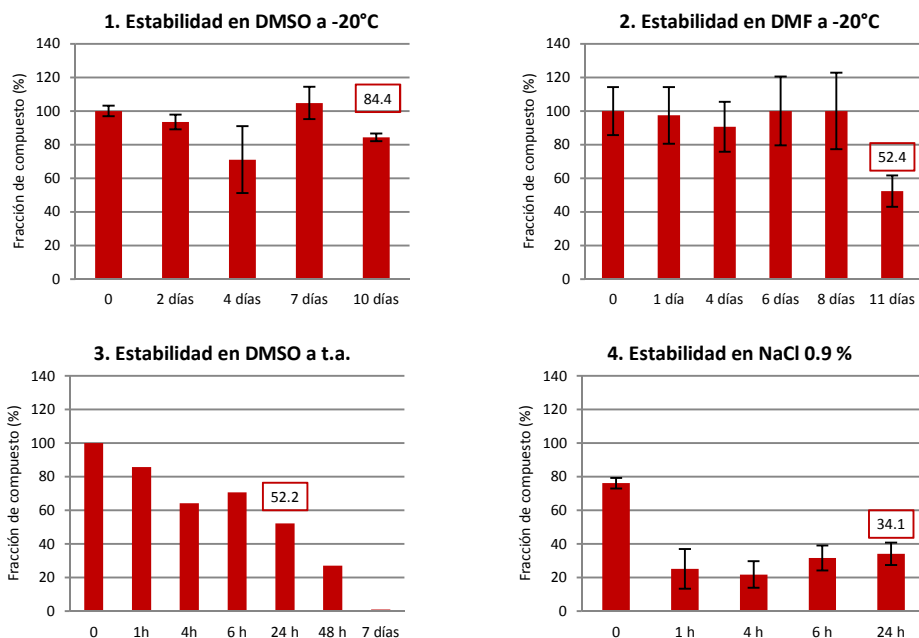
Como se describió en la introducción del presente capítulo, el principal inconveniente a la hora de desarrollar nuevos complejos antitumorales de oro(III) consiste en su elevada inestabilidad en disolución acuosa, como consecuencia tanto de una mayor labilidad cinética, como de una mayor inestabilidad termodinámica frente a la reducción. Por lo tanto, se procedió a evaluar el comportamiento en disolución de algunos de los complejos de Au(III) sintetizados.

4.3.4.1 Estabilidad

Puesto que habitualmente el DMSO es el disolvente de elección para la preparación de las disoluciones stock previas a los ensayos *in vitro* y también de HTS (high-throughput screening), las cuales son conservadas durante periodos de tiempo más o menos prolongados,¹⁵⁵ en primer lugar se determinó la estabilidad del compuesto **25d** en este disolvente, tanto a temperatura ambiente como a -20 °C. Además, se determinó su estabilidad en otro disolvente orgánico utilizado habitualmente en este tipo de ensayos, como es la DMF. Finalmente, la estabilidad del compuesto **25d** fue determinada en disolución acuosa de NaCl 0.9%, ya que es el modo habitual en que se administran los complejos antitumorales de platino en la práctica clínica.

La estabilidad del compuesto **25d** en DMSO a -20 °C y a t.a., en DMF a -20 °C, y en NaCl 0.9 % a t.a. se determinó mediante RP-HPLC, basándose en la reducción de los valores de absorbancia UV a 254 nm, tomados sobre una misma disolución de complejo a lo largo del tiempo. Los resultados se muestran en la Figura 4.14 (gráficas 1 a 4).

A -20°C, el compuesto resultó muy estable, tanto en DMSO como en DMF, permaneciendo inalterado un 84.4 % del complejo inicial a los 10 días, en el caso del disolvente DMSO y un 52.4 % a los 11 días, en el caso del disolvente DMF. Sin embargo, a temperatura ambiente la estabilidad del complejo en DMSO resultó muy inferior, por lo que en este caso fue necesario llevar a cabo el estudio de la estabilidad estableciendo intervalos de tiempo más cortos, observándose que, tras 24 h, la cantidad de complejo se redujo hasta un 52.2 % de la cantidad inicial, quedando tan solo un 1% de compuesto inalterado tras una semana. En NaCl 0.9 % el compuesto **25d** mostró una estabilidad aún más reducida, y a las 24 h tan solo permaneció inalterado un 44.1% del compuesto inicial (gráfica 4, Figura 4.14).

■ **25d****Figura 4.14**

Estabilidad del complejo **25d** en DMSO, DMF y disolución acuosa de NaCl 0.9 %.

Debido a la reducida estabilidad del compuesto **25d** a t.a., tanto en DMSO como en disolución acuosa de NaCl 0.9 %, se decidió llevar a cabo el estudio de la estabilidad del compuesto mediante ^1H -RMN, con el objetivo de identificar posibles nuevas especies en disolución procedentes de la solvatación o hidrólisis del compuesto en los disolventes utilizados. Dada la baja solubilidad del complejo en agua, el estudio se llevó a cabo en DMSO-d_6 y para ello se registró el espectro ^1H -RMN de una disolución de **25d** en DMSO-d_6 5 mM, en diferentes instantes a lo largo de 4 días, la cual se conservó a t.a. y en oscuridad durante todo el experimento. Los espectros registrados (Figura 4.15) muestran que el compuesto permanece inalterado durante los primeros 60 min, mientras que a las 24 h existe una mezcla del complejo **25d** y una nueva especie al 50%, según indica la presencia de nuevas señales en la zona de protones aromáticos. Posteriormente, la simplificación del

espectro indica la evolución de la mezcla hacia un único complejo, produciéndose la transformación completa del compuesto **25d** en la nueva especie, entre los días 3º y 4º.

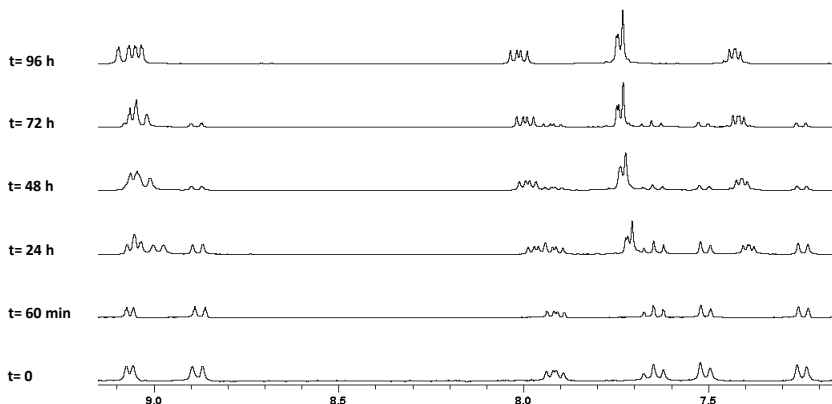


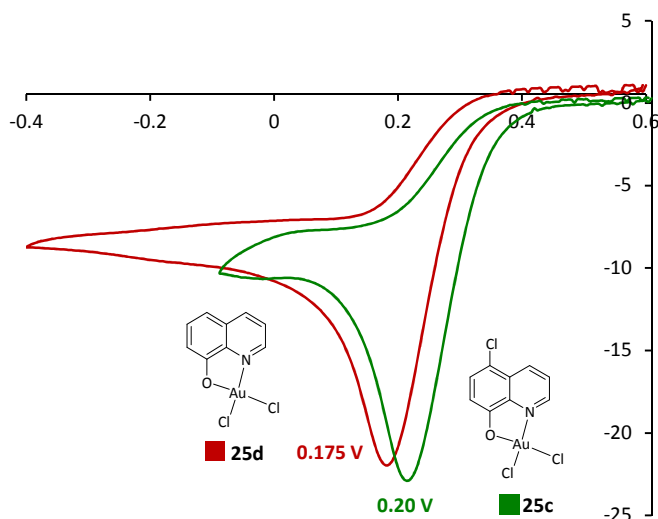
Figura 4.15

Espectros ^1H -RMN mostrando la especiación del compuesto **25d** en DMSO-d_6 , en el tiempo (registrados sobre una disolución de **25d** en DMSO-d_6 5 mM)

4.3.4.2 Propiedades electroquímicas: Voltamperometría cíclica

Debido al elevado carácter oxidante mostrado en general por los complejos de Au(III) , se decidió llevar a cabo el estudio de las propiedades electroquímicas de algunos de los complejos sintetizados, mediante o voltamperometría cíclica. El estudio fue realizado por el Dr. R. Mas Ballesté del Departamento de Química Inorgánica, de la Universidad Autónoma de Madrid.

Las propiedades electroquímicas inherentes a los complejos **25d** y **25c** fueron investigadas en CH_2Cl_2 como disolvente no coordinante. La utilización de un disolvente que no coordine a centros metálicos obedece a la intención de evitar la formación de posibles especies resultantes de la sustitución de ligandos cloruro y así restringir nuestro estudio a la estructura observada por difracción de rayos X (véase Figura 4.7). La figura 4.16 muestra los voltamperogramas registrados a 50 mV/seg en una disolución 1 mM de los compuestos **25d** y **25c** en CH_2Cl_2 conteniendo $\text{N}(\text{Bu})_4\text{PF}_6$ (0.1M) como electrolito soporte. El electrodo de trabajo utilizado fue uno de carbono vitrificado de 28 mm^2 de área. El contraelectrodo usado fue una varilla de platino y el electrodo de referencia uno de Ag/AgCl de doble camisa.

**Figura 4.1**

Voltamperogramas correspondientes a los compuestos **25d** (rojo en la figura) y **25c** (verde en la figura), registrados en disolución 1 mM en CH_2Cl_2 (0.1 M NBu_4PF_6). Velocidad de barrido: 50 mV/s. Potenciales vs Ag/AgCl.

Solo fue observado un proceso de reducción en todo el rango de potenciales de trabajo. Dicho proceso es irreversible incluso a velocidades de barrido superiores a 200mV/seg, lo que indica una rápida evolución química posterior al proceso de transferencia electrónica. Un experimento de cronoamperometría para el compuesto **25d** indicó que el proceso observado implica la transferencia de dos electrones, por lo que se asigna a la reducción Au(III)/Au(I) . Tanto la intensidad, como los potenciales observados para la reducción de los compuestos **25d** y **25c** son muy similares, lo que sugiere que ambos procesos corresponden a una reducción Au(III)/Au(I) y que la presencia de un átomo de cloro en la posición cinco del ligando tiene una escasa influencia en la densidad electrónica del átomo de oro.

Los valores de los potenciales de reducción obtenidos para los complejos **25d** (0.175 V) y **25c** (0.20 V) se encuentran muy por debajo del valor correspondiente al par $E_{\text{Au}^{3+}/\text{Au}^+}^0$ (1.40 V), indicando una elevada estabilidad de estos compuestos frente a la reducción. Estos valores, están en concordancia con los publicados para complejos quelatos similares de Au(III) con ligandos bidentados dadores de nitrógeno, determinados en DMSO.¹⁴²

4.3.4.3 Solubilidad

Puesto que el medio más habitual de administración de los compuestos antitumorales de platino en la práctica clínica es la perfusión intravenosa en disolución de NaCl al 0.9%, se determinó la solubilidad del complejo **25c** en este medio.

La solubilidad fue calculada mediante RP-HPLC por interpolación de la absorbancia UV de una disolución saturada del complejo en, en una recta de calibrado construida a partir de las medidas de absorbancia UV de disoluciones de complejo de concentración conocida (Figura 4.17). El compuesto **25c** presentó una solubilidad de 0.020 mg/mL, en este medio, unas 50 veces inferior a la del cisplatino (1 mg/mL). El bajo valor obtenido para su solubilidad podría ser, en parte, consecuencia de su reducida estabilidad en este medio (véase gráfica 4, Figura 4.14). Sin embargo, la actividad del compuesto **25c** supera a la del cisplatino en la mayoría de las líneas ensayadas y, por lo tanto, su solubilidad podría ser adecuada para su administración intravenosa.

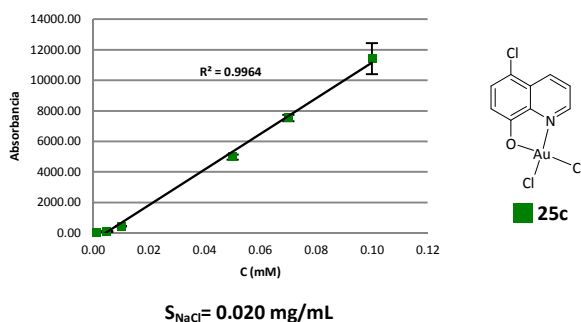


Figura 4.17

Recta de calibrado construida para la determinación de la solubilidad del complejo **25c**.

4.3.5 Estudio de interacción con el ADN

Una de las ventajas de los complejos antitumorales de oro(III) es que son capaces de evitar los fenómenos de resistencia debido a que su actividad antiproliferativa se produce como consecuencia de su interacción con dianas distintas al ADN. Así, en general, los complejos de oro(III) interaccionan con el ADN más débilmente que los complejos de platino. A la vista de la elevada actividad citotóxica mostrada por los complejos de Au(III) sintetizados, se llevó a cabo el estudio de su interacción con el ADN, con el objetivo de comprobar si esta interacción podría representar, o no, su principal mecanismo de acción. El estudio se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa, en presencia del plásmido

pBR322. Para ello se prepararon alícuotas con diferentes r_i (los valores de los r_i elegidos se indican en cada caso, donde $r_i = [\text{complejo}]/[\text{ADN}]$), las cuales fueron previamente incubadas a 37 °C, durante 24h. La capacidad de los compuestos para modificar la estructura terciaria del ADN se evaluó en función de la alteración producida en la movilidad de las formas abierta (oc) y cerrada (ccc) del plásmido, durante su migración, tomando el patrón de movilidad producido por el cisplatino como control (véase Figura 4.18), para el que la comigración de ambas bandas se produce a un valor de $r_i = 0.05$.

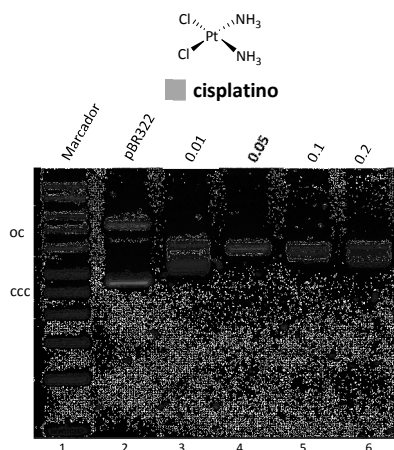
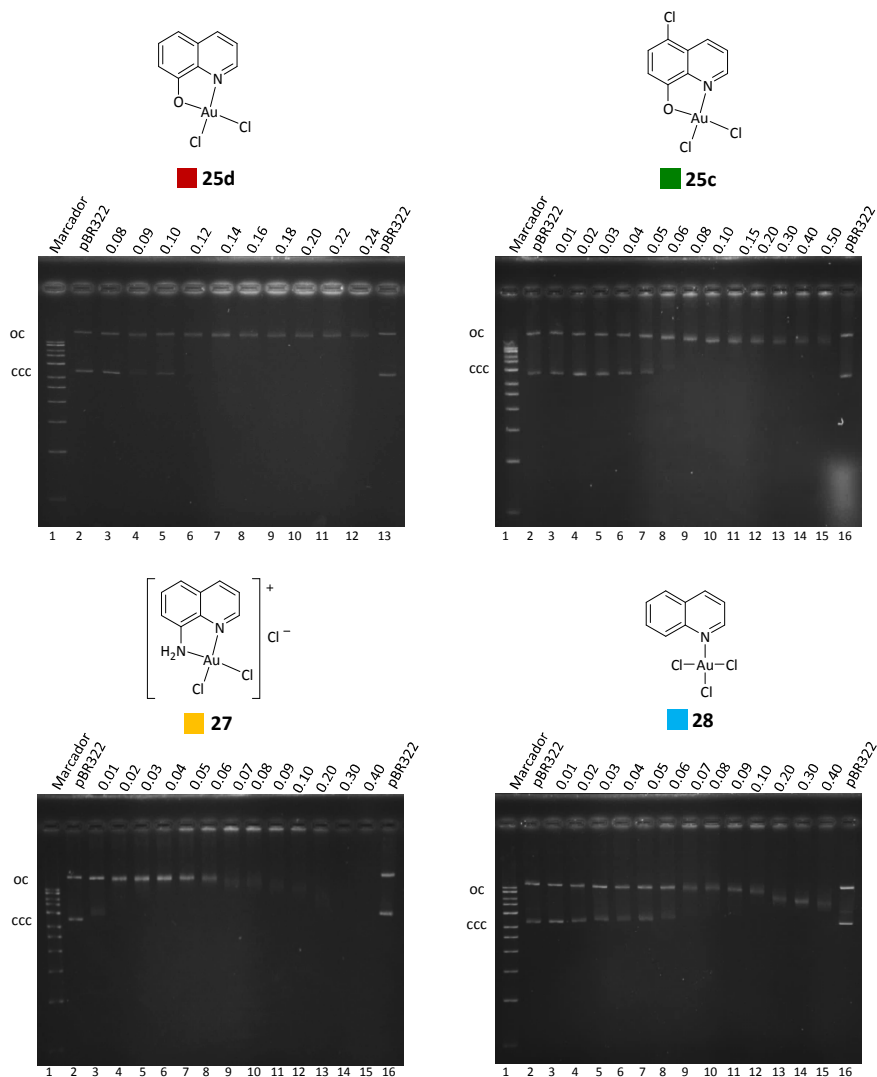


Figura 4.18

Interacción del cisplatino con el plásmido pBR322, tras 24 h de incubación a 37 °C.

En la Figura 4.19 se muestran las fotografías de los geles en los que se llevó a cabo la electroforesis de los compuestos **25c-d** y **27-28**. Los resultados muestran que la alteración producida por los compuestos **25c-d** y **27-28** en la movilidad electroforética de las bandas del plásmido, es muy distinta a la originada por el cisplatino (compárense Figuras 4.18 y 4.19). A diferencia de lo que ocurre con el cisplatino (coalescencia de las bandas oc y ccc), estos complejos de oro no provocaron una alteración significativa en la movilidad de las bandas oc y ccc del plásmido. Así, el compuesto **25d** no produjo ninguna alteración en la movilidad de las bandas, mientras que en el caso de los compuestos **25c** y **27-28** pudo observarse tanto un ligero aumento en la movilidad de la banda oc, como una ligera disminución de la movilidad de la banda ccc. Sorprendentemente, en ninguno de los casos tuvo lugar la coalescencia de ambas bandas debido a la rápida desaparición de la banda ccc para valores de r_i a partir de 0.12, 0.08, 0.02 y 0.07, para **25d**, **25c**, **27** y **28**, respectivamente; datos que no se correlacionan con la actividad citotóxica observada.

**Figura 4.19**

Interacción de los compuestos **25c-d** y **27-28** con el plásmido pBR322, tras 24 h de incubación a 37 °C. Los valores de r_1 utilizados se indican en la parte superior de cada fotografía. Las líneas 1 y 2 corresponden en todas las fotografías al marcador y al plásmido, respectivamente. Las dos bandas observadas en cada línea corresponden a las formas circulares abierta, oc, (1ª desde arriba) y cerrada covalentemente, ccc (2ª desde arriba).

La interacción de los compuestos **25c-d** y **27-28** con el plásmido indica que éstos podrían interaccionar con el ADN. Sin embargo, el patrón de esta interacción, caracterizado por una escasa movilidad electroforética de las bandas oc y ccc, y por la rápida

desaparición de la banda ccc, parece indicar que la naturaleza de esta interacción es distinta a la que tiene lugar en el caso de los compuestos de platino, apuntando un mecanismo de acción diferente, aunque desconocido por nosotros.

Adicionalmente, se llevó a cabo el estudio de la interacción con pBR322 del ligando 8-hidroxiquinolina (**19d**), con el objetivo de determinar si la actividad citotóxica de los compuestos podría deberse a la liberación del ligando de naturaleza orgánica (Figura 4.20). El ligando libre no afectó la movilidad electroforética de ninguna de las dos bandas del plásmido en el rango de valores de r_i utilizado, indicando su escasa interacción con el ADN.

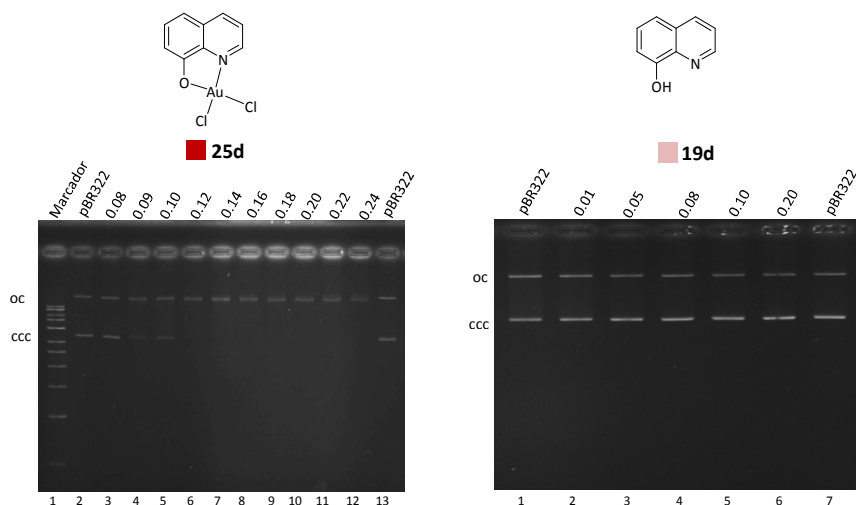


Figura 4.20

Interacción del compuesto **25d** (izqda.) y del ligando libre **19d** (dcha.), con el plásmido pBR322, tras 24 h de incubación a 37 °C. Los valores de r_i utilizados se indican en la parte superior de cada fotografía. Las dos bandas observadas en cada línea corresponden a las formas circulares abierta, oc, (1ª desde arriba) y cerrada covalentemente, ccc (2ª desde arriba).

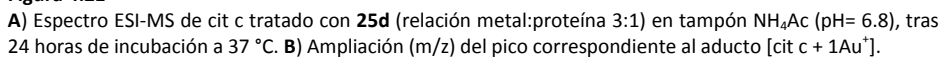
4.3.6 Estudio de interacción con proteínas: Interacción con citocromo c

Con el objeto de obtener algo más de información acerca del posible mecanismo de acción de estos complejos, se decidió llevar a cabo el estudio de su interacción con citocromo c (cyt c), un modelo de proteína globular utilizado extensamente en el estudio de complejos antitumorales de platino.^{156a-e} Este estudio fue llevado a cabo por el grupo del Profesor L. Messori, en la Universidad de Firenze (Italia). Para ello los complejos **25c-d** y **27** se incubaron con citocromo c en una relación metal:proteína 3:1, en presencia del tampón acetato amónico (pH= 6.8), y las muestras se analizaron mediante ESI-MS, tras 24h de

incubación a 37 °C. Los espectros de ESI-MS obtenidos se muestran en las Figuras 4.21-4.23 (espectros **B**).

Para los complejos **25c-d** y **27** los espectros obtenidos muestran la formación de múltiples aductos metal-proteína, tal y como demuestra la presencia de diversos picos con una masa molecular mayor que la correspondiente a la proteína nativa, de 12358 Da, (véanse espectros **A**, Figuras 4.21-4.23). El compuesto **25d** resultó el más reactivo, observándose picos de aductos metalados con una intensidad mayor que el correspondiente a la proteína nativa (espectro **A**, Figura 4.21). En todos los casos pudo observarse la formación de aductos multimetalados, con 1, 2, 3 o 4 átomos de metal unidos a la proteína, representados por los picos de 12554 Da (cit c+1Au⁺), 12750 Da (cit c+2Au⁺), 12946 Da (cit c+3Au⁺) y 13143 Da (cit c+4Au⁺). La simulación de los espectros teóricos (véase Parte Experimental) de los aductos [cit c+Au³⁺] y [cit c + Au⁺] permitió establecer, por comparación con los espectros experimentales, cuál es el estado de oxidación del metal unido a la proteína. En la Figura 4.25 (véase Parte Experimental) se muestran los espectros simulados para los aductos que contienen un solo átomo metálico, en estado de oxidación +1 (espectro **A**) o +3 (espectro **B**). La comparación de estos espectros teóricos con los espectros obtenidos experimentalmente para los complejos **25d** (espectro **A**, Figura 4.21) y **25c** (espectro **A**, Figura 4.22) revela que ambos complejos reaccionan con la proteína mediante la coordinación a través del catión Au⁺ desnudo, sin ligandos. A diferencia de los compuestos anteriores, el complejo **27** mostró un comportamiento más interesante frente a cit c. Así, en este caso, además de demostrarse la coordinación a través del catión Au⁺ desnudo (véase espectro **B**, Figura 4.23), en las mismas condiciones ha sido posible detectar para este complejo la formación de aductos en los cuales el ligando 8-aminoquinolina aún permanece unido al metal (véase espectro **A**, Figura 4.23). Además, la comparación de los espectros simulados (Figuras 4.26 y 4.27 de la Parte Experimental) con el experimental (Figura 4.24) muestra que la coordinación del fragmento [Au+8-aminoquinolina] tiene lugar tanto con el metal en estado de oxidación +3 como en estado de oxidación +1. Por lo tanto podría interpretarse que la interacción del complejo **27** con el citocromo c implica la coordinación inicial del fragmento [Au³⁺+8-aminoquinolina], el cual posteriormente se reduce a [Au⁺+8-aminoquinolina] con pérdida del ligando, observándose entonces la coordinación a través de Au⁺ desnudo.

A la vista de los resultados obtenidos frente a esta proteína modelo, parece razonable que estos compuestos de oro pudieran interactuar con distintas proteínas y, en consecuencia, que esta interacción sea la responsable de su actividad biológica, y no su interacción con el ADN.



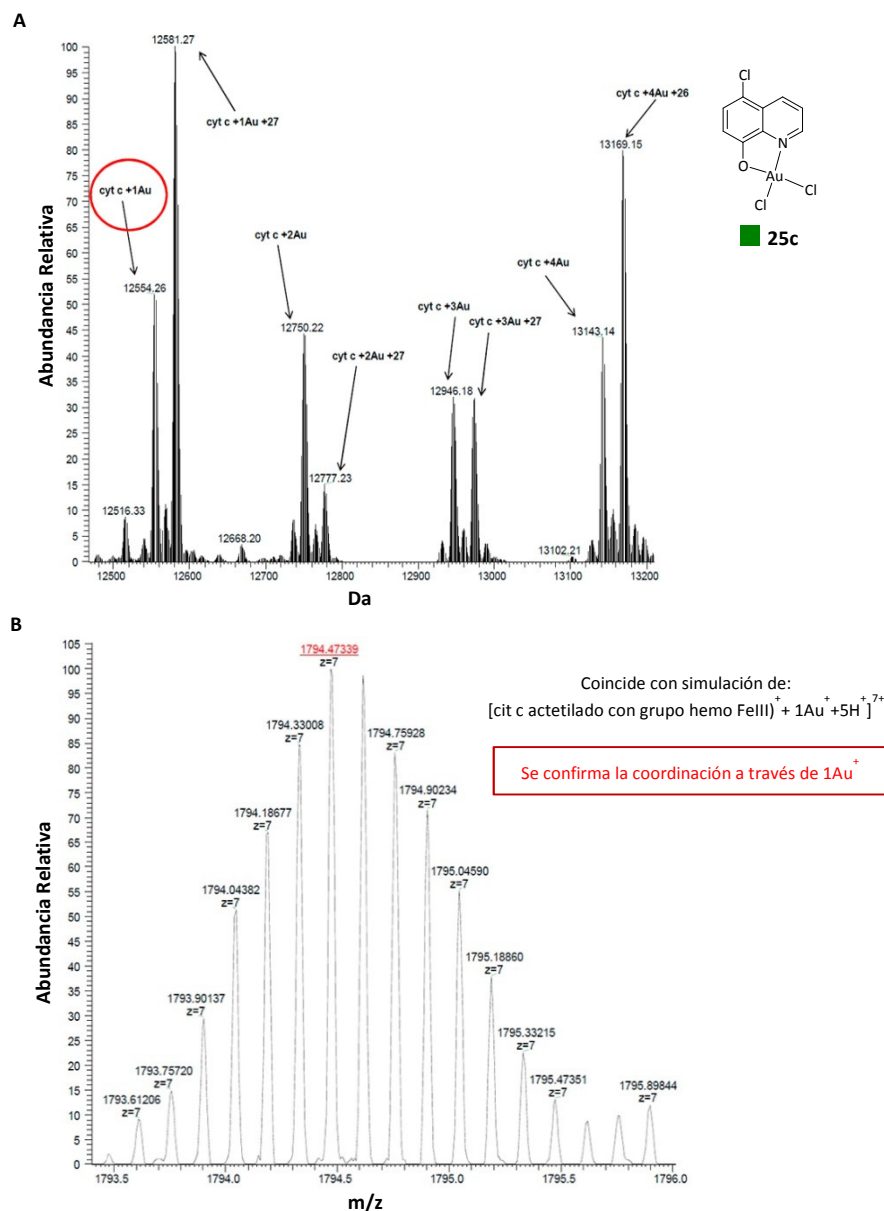


Figura 4.22

A) Espectro ESI-MS de *cyt c* tratado con **25c** (relación metal:proteína 3:1) en tampón NH_4Ac ($\text{pH} = 6.8$), tras 24 horas de incubación a 37°C . **B)** Ampliación (m/z) del pico correspondiente al aducto $[\text{cyt c} + 1\text{Au}]^+$.

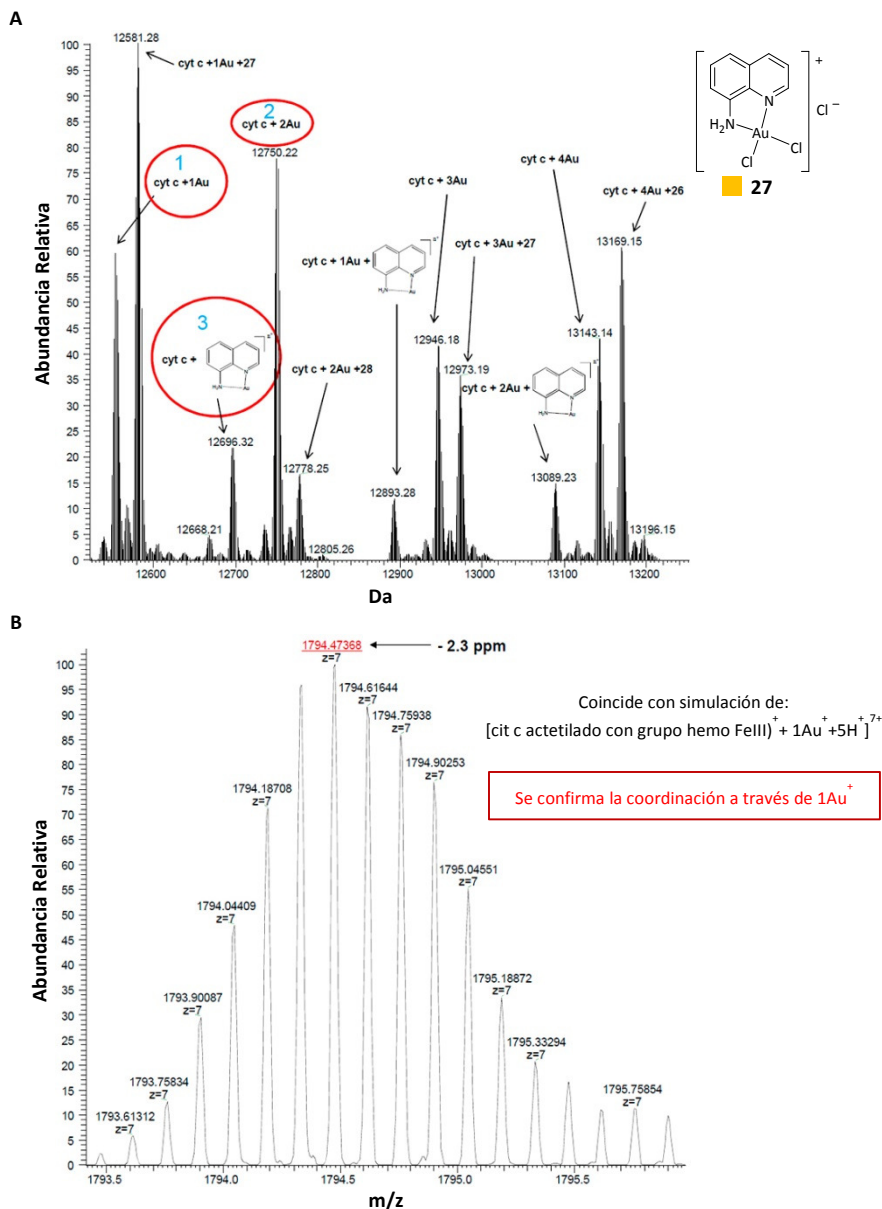
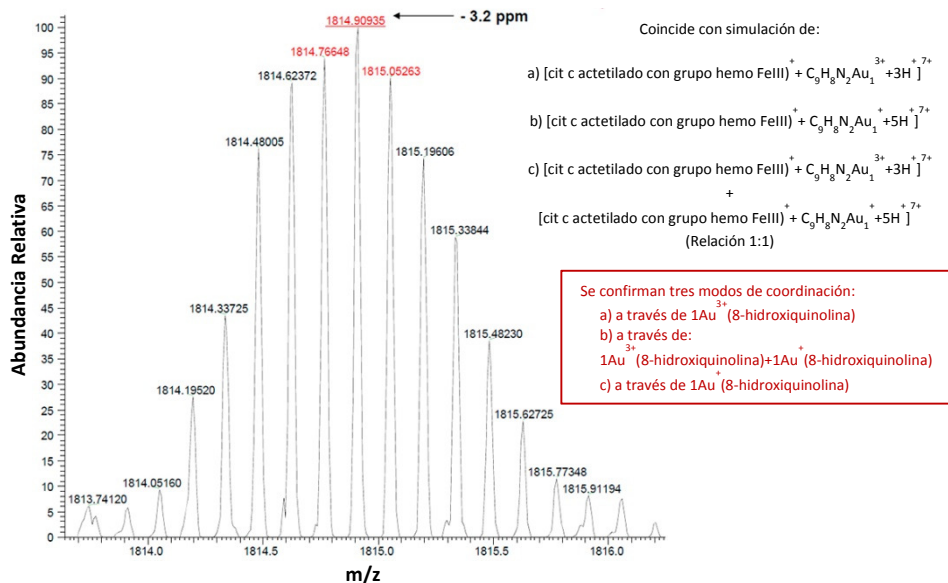


Figura 4.23

A) Espectro ESI-MS de cit c tratado con **27** (relación metal:proteína 3:1) en tampón NH₄Ac (pH= 6.8), tras 24 horas de incubación a 37 °C. B) Ampliación (m/z) del pico correspondiente al aducto [cit c + 1Au]⁺.

**Figura 4.24**

Espectro ESI-MS de cit c tratado con **27** (relación metal:proteína 3:1) en tampón NH_4Ac (pH= 6.8), tras 24 horas de incubación a 37 °C. Se confirma la presencia de los picos correspondientes a los tres aductos: [cit c + $1Au(8-hidroxiquinolina)^{3+}$], [cit c + $1Au(8-hidroxiquinolina)^{3+}$] y [cit c- $1Au(8-hidroxiquinolina)^{3+}$ + $1Au(8-hidroxiquinolina)^{3+}$].

4.4 Conclusiones

De este capítulo se extraen las siguientes conclusiones:

- 1) La presencia del quelato es imprescindible para la actividad citotóxica de los compuestos de Au(III) sintetizados, siendo el complejo [Au(5-Cl-8-hidroxiquinolato) Cl_2] el más activo de la serie, principalmente en la línea tumoral 5637. La actividad citotóxica de estos compuestos de oro(III) podría producirse a través de un mecanismo de acción diferente, como puede ser por ejemplo, mediante su interacción con distintas proteínas implicadas en la supervivencia o muerte celular, tal y como sugiere la elevada reactividad observada frente a la proteína modelo citocromo c.
- 2) Los bajos valores de los potenciales de reducción así como la falta de actividad de la 8-hidroxiquinolina libre, tanto en los ensayos de citotoxicidad, como en los ensayos de interacción con pBR322, confirman que la actividad biológica mostrada por estos compuestos de oro no se debe a la liberación del ligando orgánico, sino que es consecuencia de la presencia del metal.
- 3) La estabilidad de los compuestos en disolventes orgánicos (DMSO y DMF) es adecuada para la preparación y almacenamiento de disoluciones stock, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; sin embargo, a temperatura ambiente su estabilidad en estos disolventes es reducida.

4.5 Parte Experimental

4.5.1 Materiales

Los reactivos comerciales utilizados en la síntesis de los complejos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich y fueron utilizados, al igual que los disolventes disponibles comercialmente, sin purificación previa. El agua milliQ fue proporcionado por el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI) de la Universidad Autónoma de Madrid.

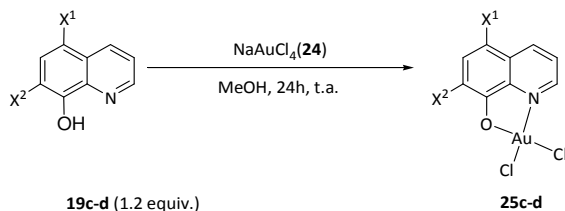
El medio RPMI 1640 utilizado en la evaluación biológica de los complejos fue comprado en Flow Laboratories (Irvine, UK), el suero fetal de ternera (FCS) en Gibco (Grand Island, NY), TCA y glutamina en Merck (Darmstadt, Germany) y penicilina G, estreptomicina, DMSO y sulforodamina B (SRB), en Sigma (St. Louis, MO). Las líneas celulares tumorales: HBL-100, HeLa, SW1573 y WiDr fueron cedidas por el Prof. G. J. Peters (VU Medical Center, Amsterdam, The Netherlands). Las líneas celulares tumorales A427, LCLC, SISO y 5637 han sido cedidas por el Profesor P. Bednarski, de la Universidad de Greifswald (Alemania). El plásmido pBR322 utilizado en los estudios de interacción con ADN fue comprado en GeneCust-thermo scientific (disolución 0.5 µg/mL).

4.5.2 Técnicas y métodos generales

Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, fueron realizados tal y como se indica en el capítulo 1, en el apartado 1.5.2.1. Los valores de los desplazamientos químicos (δ) se dan en ppm, tomando como referencia el valor del disolvente empleado, CDCl_3 (7.26 y 77.0 ppm para ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, respectivamente), CD_2Cl_2 (5.33 y 53.8 ppm para ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, respectivamente) y DMSO-d_6 (2.50 y 39.5 ppm para ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, respectivamente). Los espectros de masas se obtuvieron según se indica en el apartado 3.5.2. Los puntos de fusión se obtuvieron según se indica en el apartado 1.5.2.4. El estudio de las propiedades farmacocinéticas mediante la técnica de HPLC de fase reversa (RP-HPLC), así como el estudio de la interacción con el ADN mediante electroforesis, se realizaron según se indica en el capítulo 3, apartado 3.5.2. Para los estudios electroquímicos se utilizó un potencióstato marca Ivium, modelo compact-stat. En todos los casos, el seguimiento de las reacciones se efectuó mediante ^1H -RMN. Los productos fueron aislados puros y no fue necesaria su purificación.

4.5.3 Síntesis y caracterización de los productos

Procedimiento General 4A: Síntesis de los complejos 25c-d



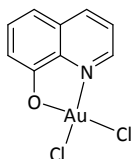
Esquema 4.3

Procedimiento experimental **4a** para la síntesis de los complejos **25c-d**.

Sobre una disolución del ligando correspondiente, **19c-d** (0.85 mmol) en MeOH (5 mL), se añade la sal NaAuCl_4 (**24**) (0.68 mmol), observándose de inmediato la aparición de una suspensión que aumenta con el tiempo. Tras 24 h de agitación a t.a., el producto se filtra en microbüchner o placa filtrante (indicado en cada caso) y el sólido se lava con H_2O y Et_2O , previamente enfriados a 0 °C. El sólido resultante se seca en un horno a 60 °C, durante 24h.

Dicloro(8-hidroxiquinolinato)oro(III)

25d



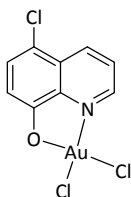
El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento general **4A**. El crudo se filtró en placa filtrante, obteniéndose el producto puro como un sólido verde, sin purificación posterior. **Rdto.**= 45%. Descomposición a $T > 155.5$ °C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_2Cl_2) δ : 9.14 (dd, $J = 5.5, 1.2$ Hz, 1H), 8.61 (dd, $J = 8.3, 1.2$ Hz, 1H), 7.73 (dd, $J = 8.4, 5.5$ Hz, 1H), 7.65 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.40 (dd, $J = 8.1, 0.7$ Hz, 1H), 7.31 (dd, $J = 8.0, 0.8$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, DMSO-d_6) δ : 164.7, 145.2, 143.2, 142.6, 131.9, 131.4, 123.0, 117.5, 114.9.

EM (MALDI): 411.0 ($[\text{M}]^+$), 376.1 ($[\text{M-Cl}]^+$), 341.1 ($[\text{M-2Cl}]^+$).

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_9\text{H}_6\text{AuCl}_2\text{NO}$: C, 26.24; H, 1.47; N, 3.40. Encontrado: C, 26.26; H, 1.61; N, 3.31.

Dicloro(5-Cl-8-hidroxiquinolinato)oro(III)**25c**

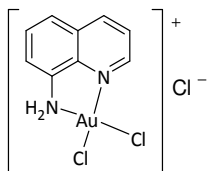
El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento general **4A**. El crudo se filtró en microbüchner, obteniéndose el producto puro como un sólido verde, sin purificación posterior. **Rdto.**= 76%. Descomposición a $T > 172.1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 9.25 (dd, $J = 5.4, 1.2\text{ Hz}$, 1H), 8.91 (dd, $J = 8.6, 1.2\text{ Hz}$, 1H), 7.85 (dd, $J = 8.6, 5.4\text{ Hz}$, 1H), 7.72 (d, $J = 8.5\text{ Hz}$, 1H), 7.26 (d, $J = 8.5\text{ Hz}$, 1H).

^{13}C -RMN (75 MHz, CD_2Cl_2) δ : 164.7, 145.7, 143.8, 140.9, 131.8, 129.6, 123.2, 120.9, 115.9.

EM (ESI $^{+}$): 444, 24 ($[\text{M}]^{+}$).

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_9\text{H}_5\text{AuCl}_3\text{NO}$: C, 24.21; H, 1.13; N, 3.14. Encontrado: C, 24.38; H, 1.29; N, 3.09.

Cloruro de dicloro(8-aminoquinolina)oro(III)**27**

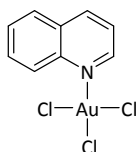
Sobre una disolución de **26** (0.85 mmol) en MeOH (5 mL), se añade NaAuCl_4 (**24**) (0.68 mmol). Tras 24 h de agitación a t.a., el producto se filtra en microbüchner y el sólido se lava con H_2O y Et_2O , a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sólido resultante se seca en un horno a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 24h, obteniéndose el producto puro como un sólido malva, sin purificación posterior. **Rdto.**= 52%.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 9.37 (dd, $J = 5.4, 1.2\text{ Hz}$, 1H), 8.50 (dd, $J = 8.3, 1.2\text{ Hz}$, 1H), 7.71 (dd, $J = 8.3, 5.4\text{ Hz}$, 1H), 7.51 (t, $J = 7.9\text{ Hz}$, 1H), 7.23 (d, $J = 7.6\text{ Hz}$, 1H), 7.03 (dd, $J = 7.8, 0.7\text{ Hz}$, 1H).

^{13}C -RMN (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 155.6, 146.0, 143.0, 139.4, 131.7, 131.0, 123.2, 116.2, 112.8.

EMAR-FAB: $[\text{M}]^{+}$ calculado para $[\text{C}_9\text{H}_8\text{AuCl}_2\text{N}_2]^{+}$: 410.9725, encontrado: 410.9717.

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_9\text{H}_8\text{AuCl}_3\text{N}_2$: C, 24.16; H, 1.80; N, 6.26. Encontrado: C, 25.48; H, 1.84; N, 6.52.

Tricloroquinolinaoro(III)**28**

Sobre una disolución de **22b** (0.85 mmol) en MeOH (5 mL), se añade NaAuCl_4 (**24**) (0.68 mmol). Tras 24 h de agitación a t.a., el producto se filtra en microbüchner y el sólido se lava con H_2O y Et_2O , a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sólido resultante se seca en un horno a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 24 h, obteniéndose el producto puro como un sólido

amarillo, sin purificación posterior. **Rdto.**= 62%. Descomposición a $T > 242.7^{\circ}\text{C}$.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 9.10 (dd, $J = 5.5, 1.3$ Hz, 1H), 8.82 (dd, $J = 8.5, 0.8$ Hz, 1H), 8.65 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.15-8.06 (m, 2 H), 7.91-7.84 (m, 1H), 7.80 (dd, $J = 8.2, 5.5$ Hz, 1H).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ : 152.0, 143.7, 143.0, 134.1, 131.3, 129.7, 129.1, 126.4, 123.1.

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_9\text{H}_7\text{AuCl}_3\text{N}$: C, 24.99; H, 1.63; N, 3.24. Encontrado: C, 24.63; H, 1.73; N, 3.12.

4.5.4 Evaluación biológica

La citotoxicidad de los compuestos de oro sintetizados se ha determinado bajo el índice GI_{50} , definido por el NCI como la concentración de droga que causa un 50% de inhibición del crecimiento celular.

El estudio de la citotoxicidad de los compuestos, en las líneas celulares tumorales: HBL-100, HeLa, SW1573 y WiDr, fue realizado tal y como se indica en el capítulo 3, apartado 3.5.4. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.4 (apartado 4.3.3).

El estudio de la citotoxicidad de los compuestos, en las líneas celulares tumorales: A427, LCLC, SISO y 5637 fue realizado por el grupo del Profesor P. Bednarski, de la Universidad de Greifswald (Alemania). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.5 (apartado 4.3.3).

4.5.5 Estudio del comportamiento en disolución

4.5.5.1 Estabilidad

a) RP-HPLC

Para el estudio de la estabilidad del compuesto **25d** en DMSO, A -20°C Y a t.a., se preparó una disolución stock 5mM del complejo en este disolvente, la cual se dividió en 2 muestras, una para el estudio a t.a., y otra para el estudio a -20°C . Para el estudio de la estabilidad en DMF se preparó una disolución 5 mM del compuesto **25d** en este disolvente. Estas disoluciones stock se conservaron en oscuridad y a la temperatura del experimento correspondiente. En los instantes indicados en cada caso, una alícuota de 100 μL de cada una de las muestras fue diluida 5x con el disolvente correspondiente (DMSO o DMF) para obtener alícuotas de concentración 1mM, las cuales se inyectaron por triplicado en el equipo de HPLC provisto de una columna de fase reversa Kromasil C18. Las condiciones de

elución fueron en todos los casos, las siguientes: gradiente ACN/H₂O (20:80), flujo= 1mL/min, λ = 254 nm, t= 10 min.

Para el estudio de la estabilidad en disolución de NaCl 0.9% se preparó una disolución stock 10 mM del compuesto **25d** en DMSO que posteriormente se diluyó 50x con disolución de NaCl 0.9%, hasta una concentración de 200 μ M (de modo que la disolución final contiene un 2 % de DMSO). Esta disolución se conservó en oscuridad y a t.a. durante el experimento, y en los instantes indicados se inyectó por triplicado en el equipo de HPLC en las mismas condiciones empleadas para el estudio de la estabilidad en DMSO.

b) H¹-RMN

Para el estudio de la estabilidad del compuesto **25d** en DMSO-d₆ se preparó una disolución 5 mM del compuesto en DMSO-d₆ y sobre esta disolución se registraron los espectros de H¹-RMN a t= 0, 60 min, 1 día, 2 días, 3 días y 4 días.

4.5.5.2 Solubilidad

La solubilidad del complejo **25c** en disolución de NaCl al 0.9%, se determinó según se indica en el aptdo. 3.5.5.1. Para ello se preparó una disolución stock 1mM del complejo en DMSO. Las condiciones utilizadas para la elución del compuesto fueron las siguientes: gradiente ACN/H₂O (50:80), flujo= 1mL/min, λ = 228 nm, t= 10 min.

4.5.6 Estudio de interacción con ADN: Interacción con el plásmido pBR322

El estudio de la interacción de los complejos de oro con el plásmido pBR322 se realizó según se indica en el apartado. 3.5.6. En este caso, se prepararon disoluciones stock de concentraciones 10, 20 y 50 μ M, mediante dilución con agua milliQ de una disolución de 1mg/mL en DMSO, del complejo a ensayar.

4.5.7 Interacción con citocromo c

El estudio de la interacción de los complejos con citocromo c fue realizado por el grupo del Profesor L. Messori, en la Universidad de Firenze (Italia). Para este estudio se utilizó citocromo c de corazón de caballo, comprado en Sigma (Código C7752). Para obtener los aductos se prepararon muestras conteniendo una concentración de proteína de 10⁻⁴ M, y oro en proporción 3:1, en disolución tampón de acetato de tetrametilamonio

(TMeAAc) (pH=7.4). Estas muestras fueron incubadas a 37 °C, durante 24 h y posteriormente, las muestras fueron ultrafiltradas utilizando un equipo Centricon YM-3 (Amicon Bioseparations, Millipore Corporation) para eliminar el complejo no unido a la proteína. Tras una dilución 20x con HCOOH 0.1%, se realizaron los espectros ESI-MS mediante la inyección directa (5µL/min) en un espectrómetro de masas Orbitrap de alta resolución (Thermo, San Jose, CA). El instrumento fue equipado con una fuente ESI convencional. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: voltaje de spray 3.1 kV, voltaje del capilar 45 V, y temperatura del capilar 220 °C. El flujo de gas se fijó a 17 a.u. y el de gas auxiliar, a 0 a.u. Para la adquisición de los datos se utilizó el software Xcalibur 2.0 (Thermo), y los espectros fueron obtenidos utilizando la herramienta integrada Xtract. Para la adquisición de los espectros se usó una resolución nominal (a m/z 400) de 100000.

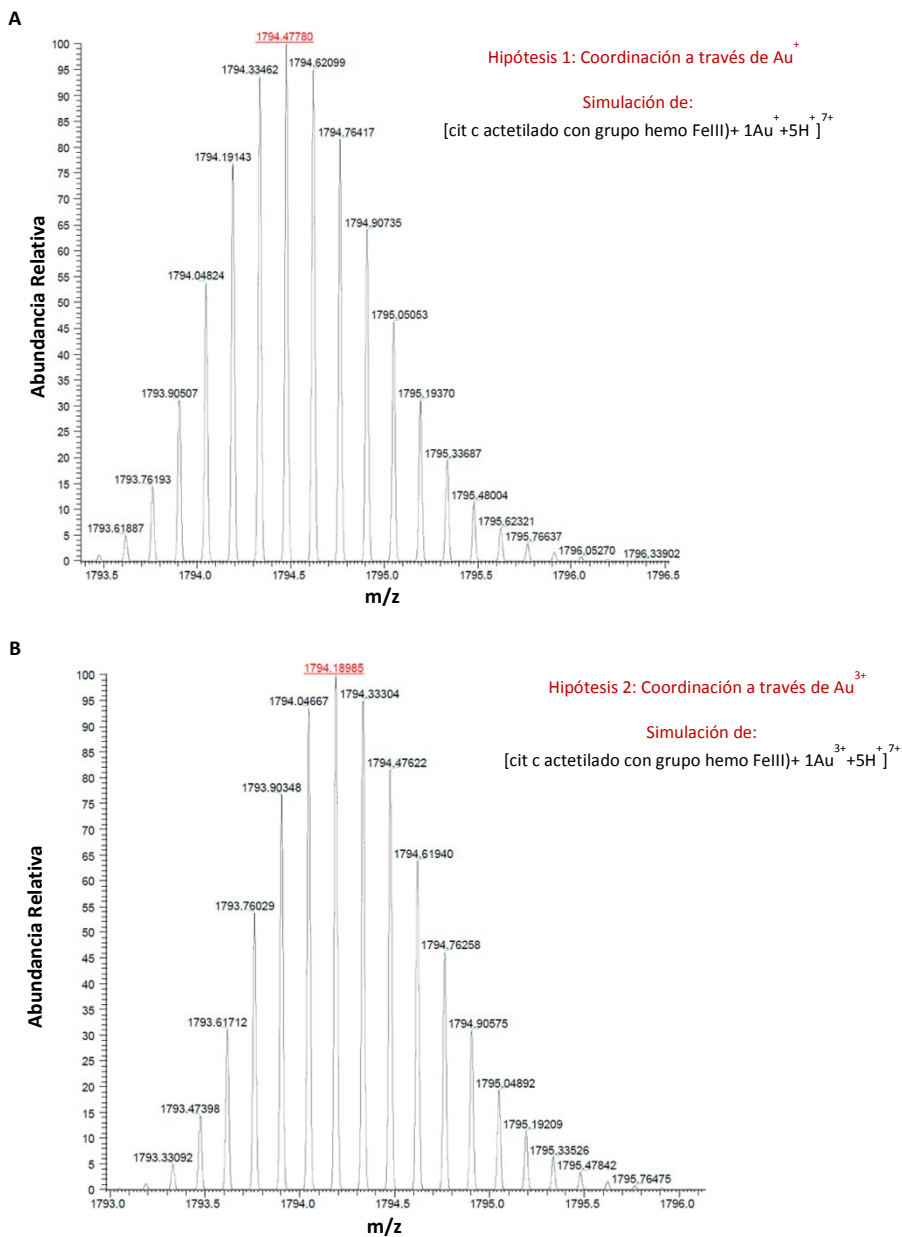


Figura 4.25

A) Simulación del espectro ESI-MS del aducto [cit c+1Au⁺]. B) Simulación del espectro ESI-MS del aducto [cit c+1Au³⁺].

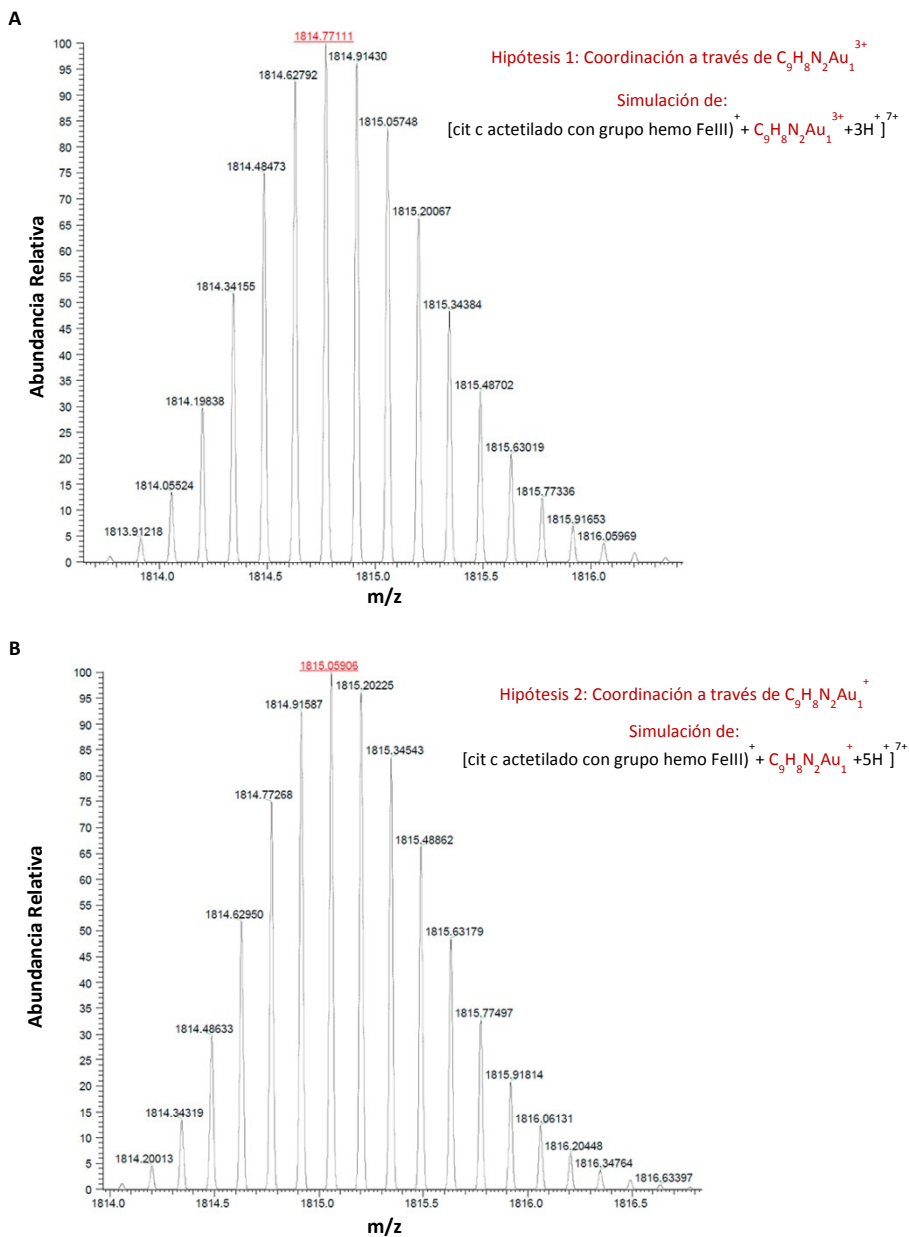
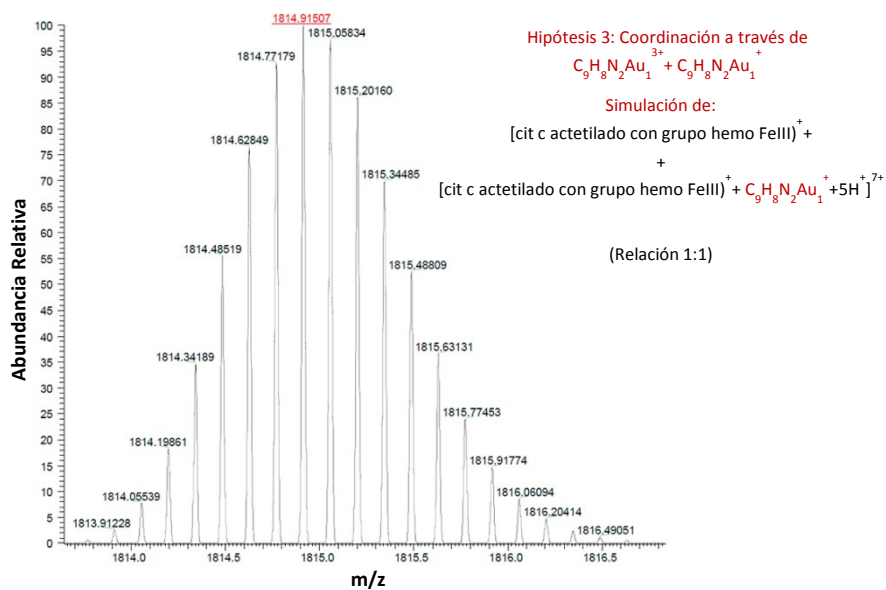


Figura 4.26

A) Simulación del espectro ESI-MS del aducto $[cit\ c+1Au(8-hidroxiquinolina)^{3+}]$. B) Simulación del espectro ESI-MS del aducto $[cit\ c+1Au(8-hidroxiquinolina)^{1+}]$

**Figura 4.27**

Simulación del espectro ESI-MS del aducto $[cit\ c+1Au(8-hidroxiquinolina)^{3+}+1Au(8-hidroxiquinolina)^+]$.

4.5.8 Asignación estructural del compuesto **25d**

La asignación estructural del compuesto **25d** se llevó a cabo mediante difracción de rayos X, según se indica en el apartado 2.5.5.). Los datos del cristal y los datos recogidos se presentan en el apartado 4.3.2, en las tablas 4.3 y 4.4, respectivamente.^p

4.6 Bibliografía

- ¹³⁰ I. Ott, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1670.
- ¹³¹ C. F. Shaw III, *Uses of Inorganic Chemistry in Medicine*; Ed. N. P. Farrell, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, USA, **1999**, pág 31.
- ¹³² A. Bindoli, M. P. Rigobello, G. Scutari, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1692.
- ¹³³ P. Calamai, S. Carotti, A. Guerri, L. Messori, E. Mini, P. Orioli, G. P. Speroni, *J. Inorg. Biochem.* **1997**, *66*, 103.
- ¹³⁴ a) Para el estudio de la citotoxicidad del complejo, véase: P. Calamai, S. Carotti, A. Guerri, T. Mazzei, L. Messori, E. Mini, P. Orioli, G. P. Speroni, *Anticancer Drug Des.* **1998**, *13*, 67; b) Para el estudio del comportamiento en disolución y reactividad con el ADN, véase: P. Calamai, A. Guerri, L. Messori, P. Orioli, G. P. Speroni, *Inorg. Chim. Acta* **1999**, *285*, 309.
- ¹³⁵ a) R. V. Parish, B. P. Howe, J. P. Wright, J. Mack, R. G. Pritchard, R. G. Buckley, A. M. Elsome, S. P. Fricker, *Inorg. Chem.*, **1996**, *35*, 1659; b) R. G. Buckley, A. M. Elsome, S. P. Fricker, G. R. Henderson, B. R. Theobald, R. V. Parish, B. P. Howe, L. R. Kelland, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 5208.
- ¹³⁶ C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, *Gold Bull.* **2007**, *40*, 73.
- ¹³⁷ A. Casini, A. Guerri, C. Gabbiani, L. Messori, *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 995.
- ¹³⁸ a) B. Hofmann, H. J. Hecht, L. Flohe, *Biol. Chem.* **2002**, *383*, 347; b) S. G. Rhee, H. Y. Chae, K. Kim, *Free Radic. Biol. Med.* **2005**, *38*, 1543.
- ¹³⁹ a) M. Coronello, Enrico Mini, B. Caciagli, M. A. Cinellu, A. Bindoli, C. Gabbiani, L. Messori, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6761; b) C. K.-L. Li, R. W.-Y. Sun, S. C.-F. Kui, N. Zhu, C.-M. Che, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 5253.
- ¹⁴⁰ a) L. Giovagnini, L. Ronconi, D. Aldinucci, D. Lorenzon, S. Sitran, D. Fregona, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1588; b) L. Ronconi, L. Giovagnini, C. Marzano, F. Bettìo, R. Graziani, G. Pilloni, D. Fregona, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 1867; c) L. Ronconi, C. Marzano, P. Zanello, M. Corsini, G. Miolo, C. Maccà, A. Trevisan, D. Fregona, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1648; d) D. Saggiaro, M. P. Rigobello, L. Paloschi, A. Folda, S. A. Moggach, S. Parsons, L. Ronconi, D. Fregona, A. Bindoli, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 1128; e) D. Aldinucci, D. Lorenzon, S. L. Stefani, L. Giovagnini, A. Colombatti, D. Fregona, *Anti-Cancer Drugs* **2007**, *18*, 323; f) V. Milacic, D. Chen, L. Ronconi, K. R. Landis-Piwowar, D. Fregona, Q. P. Dou, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 10478.
- ¹⁴¹ a) S. Carotti, A. Guerri, T. Mazzei, L. Messori, E. Mini, P. Orioli, *Inorg. Chim. Acta* **1998**, *281*, 90.

-
- ¹⁴² L. Messori, F. Abbate, G. Marcon, P. Orioli, M. Fontani, E. Mini, T. Mazzei, S. Carotti, T. O'Connell, P. Zanello, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3541.
- ¹⁴³ J.-P. Macquet, J.-L. Butour, *J. Natl. Cancer Inst.* **1983**, *70*, 899.
- ¹⁴⁴ M. P. Rigobello, L. Messori, G. Marcon, M. A. Cinellu, M. Bragadin, A. Folda, G. Scutari, A. Bindoli, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 1634.
- ¹⁴⁵ P. Shi, Q. Jiang, J. Lin, Y. Zhao, L. Lin, Z. Guo, *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 939.
- ¹⁴⁶ a) P. Shi, Q. Jiang, Y. Zhao, Y. Zhang, J. Lin, J. Ding, Z. Guo, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 745; b) H.-Q. Liu, T.-C. Cheung, S.-M. Peng, C.-M. Che, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1787.
- ¹⁴⁷ C.-M. Che, R. W.-Y. Sun, W.-Y. Yu, C.-B. Ko, N. Zhu, H. Sun, *Chem. Commun.* **2003**, 1718.
- ¹⁴⁸ a) Y. Wang, Q.-Y. He, R. W.-Y. Sun, C.-M. Che, J.-F. Chiu, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 11553; b) Y. Wang, Q.-Y. He, C.-M. Che, J.-F. Chiu, *Proteomics*, **2006**, *6*, 131.
- ¹⁴⁹ Y. Wang, Q.-Y. He, R. W.-Y. Sun, C.-M. Che, J.-F. Chiu, *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *554*, 113.
- ¹⁵⁰ Y. Wang, Q.-Y. He, C.-M. Che, S. W. Tsao, R. W.-Y. Sun, J.-F. Chiu, *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75*, 1282.
- ¹⁵¹ G. Marcon, S. Carotti, M. Coronello, L. Messori, E. Mini, P. Orioli, T. Mazzei, M. A. Cinellu, G. Minghetti, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1672.
- ¹⁵² a) A. Casini, M. A. Cinellu, G. Minghetti, C. Gabbiani, M. Coronello, E. Mini, L. Messori, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5524; b) C. Gabbiani, A. Guerri, M. A. Cinellu, L. Messori, *Open Crystallogr. J.* **2010**, *3*, 29.
- ¹⁵³ C. Martín-Santos, S. Cabrera, C. Ríos-Luci, J. M. Padrón, I. López Solera, A. G. Quiroga, M. A. Medrano, C. Navarro-Ranninger, J. Alemán, *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 13343.
- ¹⁵⁴ K. Bracht, Boubakari, R. Grünert, P. J. Bednarski, *Anti-Cancer Drugs* **2006**, *17*, 41.
- ¹⁵⁵ T. J. Waybright, J. R. Britt, T. G. McCloud, *J. Biomol. Screen.* **2009**, *14*, 708.
- ¹⁵⁶ a) C. G. Hartinger, W. H. Ang, A. Casini, L. Messori, B. K. Keppler, P. J. Dyson, *J. Anal. At. Spectrom.* **2007**, *22*, 960; b) T. Peleg-Shulman, Y. Najajreh, D. Gibson, *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *91*, 306; c) A. Casini, C. Gabbiani, E. Michelucci, G. Pieraccini, G. Moneti, P. J. Dyson, L. Messori, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 761; d) A. Casini, C. Gabbiani, G. Mastrobuoni, R. Z. Pellicani, F. P. Intini, F. Arnesano, G. Natile, G. Moneti, S. Francese, L. Messori, *Biochemistry* **2007**, *46*, 12220; e) A. Casini, C. Gabbiani, G. Mastrobuoni, L. Messori, G. Moneti, G. Pieraccini, *Chem. Med. Chem.* **2006**, *1*, 413.

Lista de publicaciones

El trabajo realizado durante esta tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- 1) "Modular Three-Component Organocatalytic Synthesis of 3,4-Disubstituted Pyrroles by a One-Pot Domino Reaction", C. Martín-Santos, C. Jarava-Barrera, A. Parra, F. Esteban, C. Navarro-Ranninger, J. Alemán, *Chem. Cat. Chem.* **2012**, 4, 976. (Factor de impacto: 5.181).

(Este artículo ha sido destacado por distintas publicaciones químicas, véase: http://www.chemistryviews.org/details/ezone/2223431/Pyrroles_from_Lego_and_Domino_s.html, y además ha sido considerado "hot-article" por la editorial Wiley: <http://wileyasialog.com/2012/09/28/organic-chemistry-the-hottest-articles/>)

- 2) "Novel clioquinol and its analogous platinum complexes: importance, role of the halogen substitution and the hydroxyl group of the ligand", C. Martín-Santos, S. Cabrera, C. Ríos-Luci, J. M. Padrón, I. López Solera, A. G. Quiroga, M. A. Medrano, C. Navarro-Ranninger, J. Alemán, *Dalton Trans.* **2013**, 42, 13343 (Factor de impacto: 4.097).

- 3) "Highly Enantioselective Construction of Tricyclic Derivatives by the Desymmetrization of Cyclohexadienones", C. Martín-Santos, C. Jarava-Barrera, S. Del Pozo, A. Parra, S. Díaz-Tendero, R. Mas-Ballesté, S. Cabrera, J. Alemán. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 5184 (Factor de impacto: 13.734).

(Este artículo ha sido destacado por la revista Synfacts :Synfacts, **2014**, 10, 978 por B. List, L. Liu).

- 4) "Novel Hydroxyquinoline Gold(III) Complexes: Synthesis, Cytotoxicities, and Interaction with Cytochrome C", C. Martín Santos, P. Bednarski, L. Messori, R. Mas-Ballesté, S. Cabrera, C. Navarro-Ranninger, J. Alemán, *Inorg. Chem.* **2014** (enviada) (Factor de impacto: 4.794).

Adicionalmente, durante el período de master se llevó a cabo otro trabajo más en el área de la química orgánica que se encuentra reflejado en la siguiente publicación:

- 5) "Tandem Cyclization-Michael Reaction by Combination of Metal- and Organocatalysis", J. Alemán, V. del Solar, C. Martín-Santos, C. Navarro-Ranninger, *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 7287. (Factor de impacto: 4.638).